

29 MAY 1995

RECIBIDO  
Turrialba, Costa Rica

**Proyecto**



**Manejo Integrado de Plagas**

**GRUPO NACIONAL DE  
CONTROL MICROBIAL**

**RECOPILACION  
SOBRE BIOENSAYOS  
Y ANALISIS PROBIT**

**1993, Nicaragua.**

## BIOENSAYO

**DEFINICION:** Bioensayo es cualquier metodo que permita determinar alguna propiedad de un material o sustancia ( insecticida ) en base a la respuesta biologica, que permiten en determinados organismos ( insectos ). Constituyen una herramienta importante para la evaluacion de los niveles de resistencia o susceptibilidad de los insectos-plagas a los insecticidas quimicos y biologicos, expresado en Dosis Letal Media ( $DL_{50}$  ), concentracion Letal Media ( $CL_{50}$ ) ó Tiempo Letal Medio ( $TL_{50}$  ).

Un bioensayo está determinado por un ESTIMULO y una RESPUESTA. El Estimulo puede ser quimico, mecanico, fisico, electrico, etc. La Respuesta son los efectos que produce el estimulo a los organismos. La respuesta o efecto puede estar dada como el incremento del tipo o cantidad total de enzimas, como el numero de latidos del corazón, como una actividad o incremento de la actividad, incremento del metabolismo. La respuesta a los estímulos va a estar en función de varios factores , estos pueden ser : cantidad del tóxico, temperatura ambiental, tiempo de exposicion, factores fisiologicos, naturaleza de los individuos ( edad, estado fisiologico, estado biologico, etc). Para obtener buenos resultados, el efecto o respuesta debe estar bien controlado y los factores que influyan deben estandarizarse de tal manera que si un bioensayo se realiza en otro lugar , debe dar la misma respuesta .

Los bioensayos entre otras cosas se pueden utilizar en :

- Para la determinacion de la toxicidad de uno o varios toxicos contra una poblacion de organismos.
- Conocer la susceptibilidad de diferentes especies a un mismo producto .
- Determinar la cantidad de toxicos de un sustrato.

Para la realizacion de un bioensayo se deben tener en cuenta los siguientes criterios:

1.- **Organismos sometidos a prueba:** dependen del objetivo del trabajo o la investigacion que se realice, todo es en base al proposito de nuestro trabajo.

2.- **Selección del organismo o especie :** lo que se recomienda es criar en el laboratorio al organismo que se va a someter a prueba, se tiene que conocer su biología, hábitos alimenticios, etc. Aunque se pueden realizar bioensayos con organismos silvestres se debe tener en cuenta el tamaño , la edad y que sean fáciles de manejar o manipular.

3.- **Facilidad del laboratorio :** debe contar con todas las condiciones adecuadas de humedad relativa, luz, temperatura ambiental. Estas condiciones deben ser similares a las que tiene el insecto en su nicho ecologico.

Para realizar alguna prueba mediante el uso de bioensayo se deben realizar **BIOENSAYOS PRELIMINARES** con el proposito de eliminar aquellas dosis o concentraciones que no sirven. Esto se conoce como **VENTANA DE RESPUESTA BIOLÓGICA**, en ella se concentra los valores de mortalidad que van de 0 a 100 %. Se escogen 5 ó 6 dosis o concentraciones con un factor de dilución de 10.

Luego se pasa a ejecutar un bioensayo donde se trabaje con intervalos iguales:

1- Se escogen 7 concentraciones o dosis dentro del rango de la ventana biológica.

2- Se calcula el valor de las **unidades logarítmicas** mediante la resta del logaritmo de la dosis mayor menos el logaritmo de la dosis menor.

3- Calcular los **intervalos de las dosis** mediante la resta del número total de dosis menos uno.

4- Calcular el **rango entre las dosis** al dividir las unidades logarítmicas entre el intervalo de las dosis.

Para la realización de un bioensayo se deben tener en cuenta una serie de factores que afectan los resultados del mismo:

- Preparación del material tóxico: el material a emplear debe de prepararse antes de cada montaje de un bioensayo, no es muy recomendable emplear una suspensión o dilución que tenga mas de 24 horas de preparada ya que la vida del ingrediente activo se ve afectada. También se debe tener en cuenta el control de calidad que se debe realizar antes de preparar esta suspensión, esto es muy importante cuando se trabaja con insecticidas microbiales ya que se debe coocer muy bien la concentración y viabilidad a que se encuentra el producto a emplear.

- El almacenamiento: el producto a emplear debe ser almacenado en condiciones ambientales apropiadas de acuerdo a su naturaleza química o biológica para no afectar su composición ni el tiempo de vida del mismo.

- El estadio e instar del insecto: Los insectos cuando se encuentran en los estadios juveniles o en los primeros instar larvales son mas susceptibles al efecto de los tóxicos. De preferencia que sean del mismo sexo.

- Tipo de dieta que se emplea: es preferible proporcionar alimento empleando dietas artificiales o semi-artificiales ya que permite disminuir el manejo sobre los insectos, en caso de tener que alimentar con dieta natural se debe cambiar cada dos días para no presentar sesgos en la mortalidad natural por estrés de alimentación.

- Volumen de dieta empleado : se debe colocar una porcion de dieta acorde con el tamaño del insecto . Cuando se colocan trozos muy grandes se presentan problemas de condensación de agua o se puede perder el efecto del ingrediente activo ( en el caso de los que se incorporan a la dieta como **Bacillus thuringiensis** o los virus de la poliedrosis nuclear).

- Tamaño y tipo de recipiente empleado : el tipo de recipiente a emplear debe de ser aquel en el cual al insecto se le trate de proporcionar las condiciones similares a su habitat. Se debe tener en cuenta el numero de insectos a colocar en cada uno así como emplear un material que le asegure al insecto una cantidad suficiente de oxigeno.

- Tecnica para integrar el material a la dieta: esto es muy importante en el caso de los insecticidas microbiales como Bt. y VPN ya que se debe colocar el insecticida en la dieta de una forma tal que este no se degenere.

- Numero de insectos por repeticion : el numero minimo a emplear para cada repeticion es de 25 ; se debe tener siempre en cuenta que se permite solo un 10 % ó 20 % de mortalidad natural dependiendo de la naturaleza del toxico. En el testigo se debe colocar el mismo numero de insectos que el de los tratamientos. Las repeticiones se hacen en diferentes dias pero a la misma hora por los ritmos circadianos (la actividad que los organismos repiten cada 24 horas).

- Numero de dosis : el maximo recomendable es de 6 ó 7 incluyendo al testigo.

- Factor de dilusion entre las dosis : el tamaño del actor de dilusion depende fundamentalmente del objetivo del bioensayo; si se desea un analisis muy riguroso se debe trabajar con valores bajos pero si es para conocer la tendencia de un toxico se puede trabajar con factores de dilusion mas altos.

- Tiempo de exposicion al toxico : depende del tipo de modo de aplicacion; en el caso de aplicacion tópica el contacto con el material es de un par de segundos ya que este se seca, lo mismo sucede cuando se trabaja mediante la inmersión del insecto. Al realizar inmersión del alimento este se debe dejar secar por lo menos una hora en la sombra para escurrir el exceso de producto. En este caso se deja este alimento al insecto 24 o 48 horas y luego se cambia por alimento fresco y libre del toxico.

- Factores fisicos ambientales : las condiciones ambientales deben ser similares a las que tiene el insecto en la naturaleza pero a la vez buscando que tambien sean adecuadas a la naturaleza del material toxico que se este empleando.

Para que un bioensayo sea estadísticamente aceptable se debe cumplir con los siguientes requisitos después de realizar el análisis Probit :

1. La mortalidad natural del testigo no debe exceder el 10% o 20%. cuando se presentan valores mayores a esto se debe eliminar el bioensayo y al igual o menor se corrige mediante la fórmula de Abbott.

2. El valor de  $X^2_1$  no debe ser menor ó igual a 5, de lo contrario los datos son muy dispersos.

3. El valor de  $CL_{50}$  ó  $DL_{50}$  debe encontrarse entre dos dosis mayores y dos dosis menores; esto se conoce como **el Equilibrio del rango de dosis**.

4. Cuatro de las dosis o concentraciones empleadas debe causar una mortalidad entre 10 y 90 %. Esto se conoce como **Amplitud del rango de dosis**.

5. La pendiente de la regresión debe tener un valor entre 1.5 y 1.6.

6. El coeficiente entre el límite fiducial mayor y el límite fiducial menor debe ser menor ó igual a 2.

7. Se debe realizar un mínimo de 3 repeticiones válidas estadísticamente y por separado cada una en el tiempo.

8. El coeficiente de variación del  $CL_{50}$  media (de las repeticiones) debe ser igual ó menor de 20%.

## BIOENSAYO

SE DEFINE COMO CUALQUIER METODO QUE MIDE ALGUNA PROPIEDAD DE ALGUN MATERIAL, EN TERMINOS DE RESPUESTA BIOLOGICA. TOMA AL ORGANISMO VIVO COMO APARATO DE MEDICION Y ESTABLECE EL PARAMETRO BIOLOGICO DE MORTALIDAD PARA RELACIONAR EL FENOMENO CAUSAL CON EL EFECTO SOBRE EL ORGANISMO. (Ibarra, 1990)

SEGUN ALVES, MEDIANTE EL BIOENSAYO SE PUEDE EVALUAR EL POTENCIAL DEL PATOGENO PARA EL CONTROL DE DETERMINADA PLAGA. ESTE POTENCIAL SE MIDE CON LOS SIGUIENTES PARAMETROS:  $DL_{50}$  ,  $TL_{50}$  ,  $DE_{50}$  Y  $CL_{50}$  .

## PARAMETROS

$DL_{50}$  : DOSIS LETAL MEDIA.

MIDE LA INFECTIVIDAD DEL PATOGENO QUE PROVOCA EL 50% DE MORTALIDAD EN LA POBLACION

$TL_{50}$  : TIEMPO LETAL MEDIO.

MIDE LA VIRULENCIA DEL PATOGENO. EL TIEMPO QUE LLEVA MATAR EL 50% DE LA POBLACION O EL EFECTO DE UNA DOSIS DETERMINADA.

$DE_{50}$  : DOSIS EFECTIVA MEDIANA.

ES UNA DOSIS SOBRE LA CUAL EL 50% DE LA POBLACION ES AFECTADA EN UN ORGANO O EN UNA FUNCION.

$CL_{50}$  : CONCENTRACION LETAL MEDIA.

ES UNA DOSIS O CONCENTRACION QUE PRODUCE EL 50% DE MORTALIDAD. NO ES POSIBLE CONOCER EXACTAMENTE LA CANTIDAD DEL PATOGENO QUE EL INSECTO INGIERE O RECIBE SOBRE SU CUERPO.

## TECNICAS O METODOS DE EXPOSICION

### 1. APLICACION TOPICA .

SE COLOCA UNA GOTA DEL TOXICO SOBRE EL TORAX DEL INSECTO. SE EMPLEAN MICROAPLICADORES O MICROJERINGAS. EL TAMAÑO DE LA GOTA DEPENDE DEL PESO DEL INSECTO. SE LOGRA DETERMINAR LA DOSIS LETAL MEDIA.

### 2. ASPERSION .

SE PARECE A LA SITUACION DEL CAMPO. SE EMPLEAN CAMARAS DE ASPERSION O PLANTAS APLICADAS CON BOMBAS SE LLEGA A DETERMINAR LA CONCENTRACION LETAL MEDIA.



## 5. INCORPORACION A LA DIETA .

EL TOXICO SE AGREGA A LA DIETA QUE SE LE PROPORCIONA AL INSECTO. ESTA INCORPORACION SE REALIZA ANTES DE QUE LA DIETA SE SOLIDIFIQUE O DESPUES ( EN ESTE CASO SE DEBE ESPERAR UNOS 10 MIN. PARA QUE LA SUSPENSION SE SEQUE). PARA AMBOS CASOS SE LLEGA A CONOCER LA CONCENTRACION LETAL MEDIA.

## FACTORES QUE AFECTAN UN BIOENSAYO

1. LA PREPARACION DEL MATERIAL TOXICO.
2. EL ALMACENAMIENTO .
3. ESTADIO E INSTAR DEL INSECTO .
4. TIPO DE DIETA QUE SE UTILIZA .
5. VOLUMEN DE DIETA EMPLEADO .
6. TAMAÑO Y TIPO DE RECIPIENTE EMPLEADO .
7. TECNICA PARA INTEGRAR EL MATERIAL A LA DIETA .
8. NUMERO DE INSECTOS POR REPETICION .
9. NUMERO DE DOSIS POR BIOENSAYO .
10. FACTOR DE DILUSION ENTRE LAS DOSIS .
11. TIEMPO DE EXPOSICION AL TOXICO .
12. FACTORES FISICOS AMBIENTALES ( $T_0$  , % HR ,  
FOTOPERIODO)

BIOENSAYOS CON HONGOS ENTOMOPATOGENOS

INSECTO (ESTADIO)	PATOGENO	METODO EMPLEADO	AUTOR (AÑO)
<i>Nezara viridula</i> <i>Diabrotica speciosa</i> (ninfas y adultos) (Cultivo : Soya)	<i>Beauveria bassiana</i>	Aspersión de suspensión acuosa. Insecto colocado individualmente. Cuento diario de mortalidad. Alimento natural colocado en papel filtro húmedo.	Lesche T. G. <u>et.al.</u> (1979)
<i>Pieris rapae</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Trichoplusia ni</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Se aplica 0.1 ml de suspensión acuosa a la superficie de discos de hojas (4.8 cm. diam.) y se deja secar 15 min. La mortalidad se lee a 48 y 72 horas después de la exposición y al octavo día.	Ignoffo C.M. <u>et.al.</u> (1979)
<i>Pecan weevil</i> (larvas de 1er. instar)	<i>Beauveria bassiana</i>	Se aplican 2 ml de suspensión a papel filtro estéril, se colocan las larvas por 5 min. y se retiran a copas individuales con dieta limpia. También se agrega 10 ml. de suspensión a 95 cm <sup>2</sup> de suelo estéril y se colocan las larvas. La mortalidad se lee a los 21 días.	Champlin F.R. <u>et.al.</u> (1981)
<i>Chalcoedermus bimaculatus</i> (larvas y adultos)	<i>Beauveria bassiana</i>	Grupos de 10 insectos se esprayen con 0.3 ml. de suspensión acuosa. Los adultos se colocan en 20 g. de suelo estéril y las larvas en platos petri con papel filtro y parte de la planta como alimento.	Quintela E.D. <u>et.al.</u> (1990)
<i>Galleria mellonella</i> (larvas)	<i>Beauveria bassiana</i>	Para conocer el potencial de aislados monosporicos las larvas se esprayen con una suspensión acuosa (1 ml).	Samsinakova <u>et.al.</u> (1983)
<i>Castnia licus</i> (larvas de 50 mm long.) (Cultivo:Caña de azúcar)	<i>Beauveria spp</i>	Las larvas se sumergen por 10 seg. y se colocan individual. El alimento es trozos de caña y se cambia cada dos días. La mortalidad se lee diario.	Vilas Boas A. <u>et.al.</u> (1988)

<i>pothenemus hampei</i> (adultos) cultivo: Café)	<i>Beauveria bassiana</i>	Se sumergen en suspensión acuosa granos , discos de hoja (4.5 cm. diam.) e insectos por 5 seg. Las observaciones son cada dos días.	Fernandes P.M. <u>et.al.</u> (1985)
<i>ichoplusia ni</i> (cultivo: Repollo) (larvas)	<i>Beauveria bassiana</i>	En la parte superior de discos de hoja se asperja 0.1 ml de suspensión acuosa del hongo. Se deja secar por 15 min. y se colocan 3 larvas por disco en cada plato petri. La mortalidad se lee al 7mo. y 10mo. día.	Ignoffo C.M. <u>et.al.</u> (1982)
<i>amestra brassicae</i> (Diptera littoralis)	<i>Nomuraea rileyi</i>	Grupo de 20 huevos se esprayan en cajas plásticas de 4 cm <sup>3</sup> , si emergen larvas se colocan individuales con discos de hoja por alimento. La mortalidad se determina por la presencia del hongo sobre el cuerpo del insecto.	Rodriguez D. <u>et.al.</u> (1980)
<i>tyctes rhinocerus</i> (adultos)	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Los adultos son esprayados con una suspensión acuosa (10 ml.), Se deja secar el tegumento y se colocan en platos petri. Cuando mueren se colocan en cámara húmeda.	Ferron P. <u>et.al.</u> (1975)
<i>nasutitermis exitiosus</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	En grupo de 25 los termites se colocan en plato petri con papel filtro estéril y se espraya 1 ml a una distancia de 20 cm . Los muertos se colocan en cámara húmeda.	

## REQUISITOS

1. LA MORTALIDAD NATURAL EN EL TESTIGO NO DEBE EXCEDER AL 10 % .
2. EL VALOR DE  $\chi^2$  NO DEBE SER  $< \text{ó} = 5$ . DE LO CONTRARIO LOS DATOS ESTAN MUY DISPERSOS.
3. EL VALOR DE  $CL_{50}$  ó  $DL_{50}$  DEBE TENER DOS DOSIS MAYORES Y DOS DOSIS MENORES; ESTO SE CONOCE COMO "EL EQUILIBRIO DEL RANGO DE DOSIS" .
4. CUATRO DE LAS DOSIS O CONCENTRACIONES EMPLEADAS DEBEN CAUSAR UNA MORTALIDAD ENTRE 10 Y 90 % .ESTO SE CONOCE COMO "AMPLITUD DEL RANGO DE DOSIS" .
5. LA PENDIENTE DE LA REGRESION CON UN VALOR ENTRE 1.5 - 1.6 .
6. EL COEFICIENTE ENTRE EL LIMITE FIDUCIAL MAYOR Y EL LIMITE FIDUCIAL MENOR DEBER SER  $< \text{ó} = 2$  .
7. TENER 3 REPETICIONES VALIDAS ESTADISTICAMENTE Y POR SEPARADO EN EL TIEMPO .
8. EL COEFICIENTE DE VARIACION DE  $CL_{50}$  MEDIA (DE LAS REPETICIONES) DEBE SER  $= \text{ó} < 20\%$  .

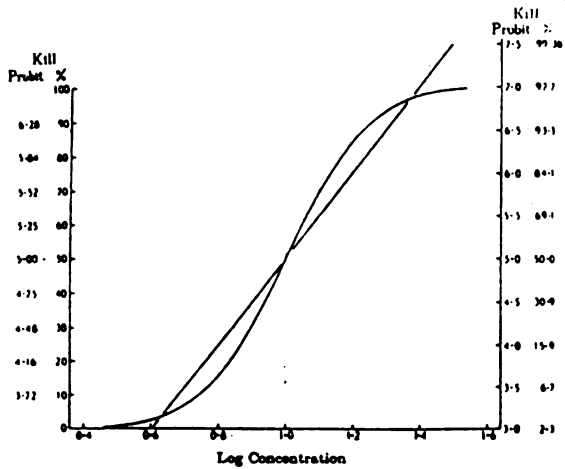


Fig 1 : Transformation log-probit de la sigmoïde dose-mortalité (d'après FINNEY, 1947)

Ces DL50 ou CL50 sont déterminés par l'application d'une série de doses ou de concentrations croissantes, généralement en progression géométrique ; le nombre de mises est généralement compris entre 3 (nombre minimum) et 7 ; la dose la plus faible est choisie pour obtenir environ 10 % de mortalité, la dose la plus forte, environ 90 %. La raison (r) de la progression géométrique peut être calculée par la formule suivante où n est le nombre de doses appliquées :

$$\log r = \frac{\log \text{dose } n - \log \text{dose } 1}{n-1}$$

Les lots traités (minimum 20 insectes par lot en 1 ou plusieurs répétitions) sont toujours accompagnés d'un lot témoin qui subit les mêmes manipulations.

L'interprétation de l'essai se fait à partir de mortalités corrigées en utilisant la formule d'Abbott :

$$\% \text{ Mortalité Corrigée} = \frac{\% \text{ Mortalité Observée} - \% \text{ Mortalité Témoin}}{100 - \% \text{ Mortalité Témoin}} \times 100$$

La détermination des DL50 ou CL50, des intervalles de confiance et des régressions doses-mortalité se fait généralement par la méthode des probits de FINNEY qui permet de linéariser les courbes obtenues par une double transformation (voir figure 1).

## II - PRINCIPALES METHODES DE TEST

On distingue classiquement 3 grands types de méthodes :

- les méthodes de contact
- les méthodes d'ingestion
- les méthodes de fumigation

### 1. Les méthodes de contact

#### 1.1. Contact direct

Le produit agit sur l'insecte ou l'acarien lui-même, selon une méthode d'application variable :

- immersion
- pulvérisation (Tour de Potter, Tour de Burgerjon)
- application topique

#### 1.2. Contact indirect

Le produit agit sur l'insecte par un intermédiaire qui peut être naturel (plante, fragment de feuille, ou bien artificiel tel qu'une surface inerte (boite de Peat, facon de verre, papier filtre), cet intermédiaire pouvant être traité par différentes méthodes (immersion, pulvérisation, dépôt d'un film insecticide)

#### 1.3. Contact mixte

Le produit est appliqué sur l'ensemble insecte, plante ou support inerte, généralement par pulvérisation.

### 2. Les méthodes d'ingestion

Les essais pratiqués à l'aide de méthodes d'ingestion peuvent être menés par administration orale directe chez l'insecte ou par administration orale indirecte par le biais d'une activité systémique de la matière active.

### 3. Les méthodes de fumigation

Ces méthodes nécessitent généralement un appareillage sophistiqué et ne sont utilisées que pour les produits particuliers, les fumigants ou parfois certains insecticides présentant de fortes tensions de vapeur.

### III - CHOIX DE LA METHODE - ECUEILS A EVITER

Au moment de choisir une méthode trois points principaux sont à considérer :

- l'insecte ou l'acarien
- l'insecticide
- ce que l'on cherche à montrer ou à mesurer c'est-à-dire la finalité de l'expérimentation.

#### 1. L'insecte ou l'acarien

En fonction de la morphologie, de la physiologie et du comportement de l'espèce le choix de la méthode d'intoxication d'une part et du ou des stades de l'arthropode considéré d'autre part, vont être extrêmement importants : un acarien ne pourra pas offrir autant de possibilités d'applications qu'un criquet, un insecte ailé posera certains problèmes que ne posera pas une espèce aptère, un puceron est beaucoup plus fragile qu'un charançon.

#### 2. L'insecticide

La connaissance du produit à tester est essentielle. La méthodologie devra être adaptée à la rapidité d'action du produit et à son mode d'action, l'un et l'autre étant d'ailleurs souvent liés.

La plupart des produits agissent sur la majorité des espèces assez rapidement (de quelques minutes à quelques dizaines d'heures) ; c'est le cas en particulier des molécules neurotoxiques qui représentent plus de 80 % des insecticides commercialisés (organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides, ...). Cependant, même dans ce cas, des différences importantes existent d'une part dans le temps de réponse et d'autre part dans la pérennité de celle-ci. La figure 2 en est une illustration. Le cas des pyréthrines et des pyréthrinoides illustre une de ces difficultés : ils provoquent un état de choc chez l'insecte (le "knock-down") suivi d'une phase de récupération. La durée de l'essai devra donc tenir compte de ces données.

D'autres insecticides ou acaricides agissent différemment, en particulier les groupes de régulateurs de croissance tels les benzoyl-urées, les analogues d'hormone juvénile, le fenoxycarbo, la buprofezine et certains acaricides. Ces produits ont comme caractéristique d'agir uniquement sur certains stades et souvent à plus ou moins long terme, les effets apparaissant plusieurs jours après l'application du produit. Certains acaricides n'ont que des effets ovicides.

L'approche méthodologique se complique lorsque l'on ne connaît pas a priori le mode d'action insecticide ou les divers types d'effets biologiques (ovicide, larvicide, adulticide, stérilisants, ...).

Il faut également noter que certaines molécules sont beaucoup plus actives par ingestion.

#### 3. Finalité de l'expérimentation

La méthodologie de l'étude doit être construite en fonction du but recherché.

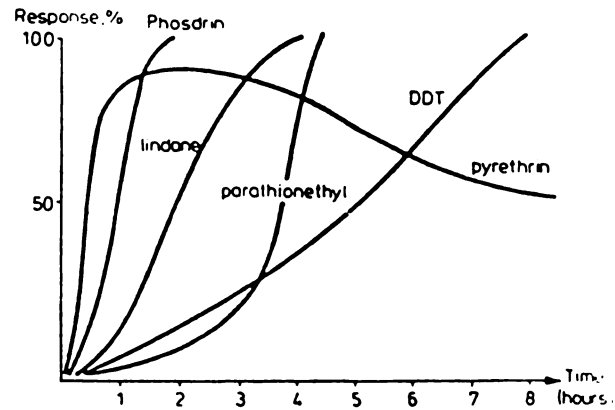


Fig 2 : Courbes de réponse à l'intoxication pour différents insecticides (d'après BANKI, 1978)

31. Comparaison de l'efficacité de différents insecticides

C'est le cas apparemment le plus simple. On compare au laboratoire dans des conditions standardisées la toxicité de diverses molécules sur une même souche d'insectes. Le choix de la méthode va cependant jouer sur l'efficacité relative des produits et donc sur leur classement : des tests par contact ne donneront pas le même ordre que des tests par ingestion. Si le but de l'essai est de montrer la toxicité intrinsèque des matières actives, d'une part par ingestion et d'autre part, par contact, pas de problème. Par contre si le but est d'obtenir des informations quant à l'efficacité pratique sur le terrain, il faudra choisir une méthodologie appropriée : laquelle ? Le principe de base est d'essayer de se rapprocher au mieux des conditions du terrain : application du produit selon les mêmes modalités (pulvérisation, traitement de sol et effets systémiques, traitement direct ou non des ravageurs, stades visés par les traitements pratiques)

32. Comparaison de la toxicité relative pour des coulees hôtes-parasitoides ou proies-prédateurs

C'est le cas où la méthodologie est la plus complexe. La mise au point de tests simples, rapides et reproductibles tels qu'ils sont généralement préconisés ne donne pas toujours des résultats fiables quant à leur extrapolation à la pratique. En effet il ne prennent généralement en compte certains points fondamentaux comme le mode d'application des pesticides et surtout la biologie des espèces considérées. De plus, ces tests simplifiés ne donnent qu'une mesure absolue de la toxicité du pesticide alors qu'il paraît plus important de prendre en considération les toxicités différentielles pour l'antagoniste et pour sa proie et les équilibres résultant du traitement. Le principe général suivant doit être appliqué : les effets des produits sont mesurés sur des associations hôte-parasitoïde (ou hôte-prédateur) où sont présents les différents stades de chaque espèce et les temps d'observations sont choisis de telle sorte que tout effet toxique puisse en principe être mis en évidence.

33. Détection et mesure des résistances chez les insectes et acariens

La notion de résistance est souvent confondue avec l'échec pratique de traitement. Il faut bien distinguer les deux phénomènes, l'échec pouvant être dû à toute autre chose qu'à une évolution de la sensibilité du ravageur et, réciproquement, une souche peut avoir développé une résistance, sans que cela entraîne forcément des échecs de traitement dans la mesure où l'espèce au départ était très sensible et où le niveau de résistance atteint est faible. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes de détection et d'estimation de l'ampleur du phénomène. D'une manière générale l'implantation d'une résistance ne peut s'apprécier que par comparaison de la sensibilité d'un échantillon donné à celle d'une souche sensible de référence. Deux types de méthodes sont généralement utilisées :

331. Technique de la dose discriminante

Cette méthode utilisée par l'OMS depuis une quarantaine d'années consiste à soumettre les échantillons d'insectes supposés résistants à une dose double de la dose provoquant 100 % de mortalité chez les insectes d'une souche sensible de référence. Les insectes survivants sont considérés comme résistants. Cette technique est intéressante dans le cas de populations hétérogènes : elle permet de déterminer une fréquence d'individus résistants. Par contre elle ne permet pas de définir le niveau de résistance de ces individus.

332. Technique des doses sérielles - Recherche des doses

Il s'agit de déterminer par l'application d'une série de doses croissantes d'insecticide la relation, pour chaque souche d'insectes, existant entre la dose de produit et la mortalité. Ceci permet de déterminer la dose provoquant 50 % de mortalité (le DL50). On définit généralement le niveau de résistance par le rapport

$\frac{DL50 \text{ souche résistante}}{DL50 \text{ souche sensible}}$

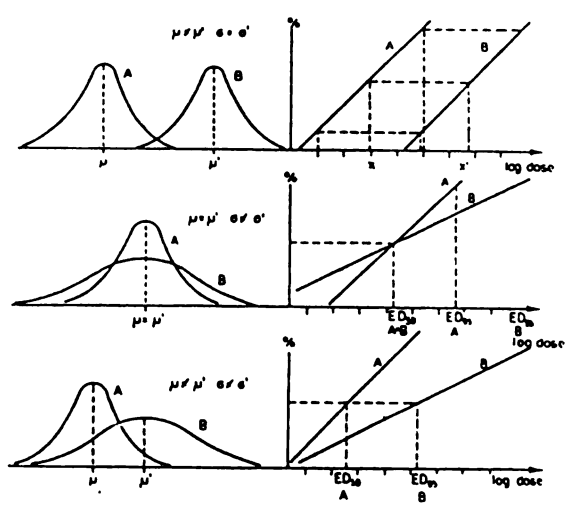


Fig 3 : Différents types de réponses possibles pour des souches de sensibilité différente (d'après BANKI, 1978)



### EFFETS SECONDAIRES DES PESTICIDES SUR LES ENNEMIS NATURELS DES RAVAGEURS

B. Seuphanor

INRA, Laboratoire de Recherches de Zoologie et d'Apologie  
Domaine St Paul, BP 91, 84143 MONTFAVET

Il est bien évident que ce coefficient n'est pas absolu, le choix de la souche sensible de référence étant primordial : il peut s'agir d'une souche de laboratoire ou bien d'une souche prélevée dans la nature dans des zones en principe non traitées. Les souches sensibles de laboratoire ont l'avantage d'être fort bien connues mais n'étant pas soumises aux facteurs naturels de sélection, on peut constater qu'elles sont souvent jusqu'à 10 fois plus sensibles que des souches issues de zones non traitées. On préconise maintenant d'éviter le recours aux souches de laboratoire en tant que souches sensibles et de prendre comme référence des souches prélevées sur le terrain et normalement contrôlées dans les conditions de la pratique.

Outre l'importance primordiale du choix de la souche sensible de référence, d'autres facteurs peuvent faire varier le coefficient de résistance, en particulier les techniques utilisées pour déterminer les DL50, et le stade de l'insecte testé.

Il est important d'utiliser des techniques d'application de l'insecticide au laboratoire, se rapprochant autant que possible de celles utilisées au champ surtout dans le cas de produits ayant un effet important sur le comportement, comme les pyréthrinoides ; on peut citer comme exemple la résistance de *Alysiid perisore* à la perméthrine : le coefficient de résistance mesuré à 35 par application topique passe à 87 lorsque l'insecte est placé dans de petites cages sur feuilles traitées (SAWICKI et RICE, 1978).

Le stade de l'insecte utilisé peut entraîner également de très fortes variations dans la mesure du coefficient de résistance. PRIESTER et GEORGIADIS (1980) ont obtenu par sélection au laboratoire une souche de *Culex quinquefasciatus* résistante à la deltaméthrine : le coefficient de résistance mesuré par application topique sur adultes est de 28 ; il passe à 4100 lorsque la mesure est effectuée sur larves en milieu aqueux.

Entre deux méthodes d'intoxication par contact, il est possible d'enregistrer pour un même stade des différences extrêmement importantes : à l'INRA de Versailles nous avons sélectionné une souche de *Drosophila melanogaster* pour sa résistance à la deltaméthrine : le coefficient de résistance lorsqu'il est mesuré par méthode topique est de 200 ; en contact larval il est supérieur à 140 000.

Ces arguments démontrent bien que le coefficient de résistance est une notion relative et qu'il est dangereux voire impossible comme on le préconisait voici une vingtaine d'années de fixer un niveau (par exemple 10) en deçà duquel il n'y a pas de résistance ou au delà duquel la résistance aura une importance pratique.

Enfin, il faut bien préciser que le coefficient de résistance déterminé par un rapport de DL50 n'est valable que si la souche résistante est suffisamment homogène ; on peut également mentionner que deux souches peuvent avoir des DL50 identiques mais, par exemple des D90 assez différentes (voir fig. 3).

#### IV - CONCLUSIONS

Intoxiquer un insecte avec un toxique est chose simple ; le faire de façon précise est moins facile, le faire de façon répétitive est difficile, en tirer des résultats fiables et extrapolables dans certaines limites à la pratique est encore plus complexe.

La méthodologie retenue doit s'appuyer en premier sur le but recherché : quel type de données attend-on. En second lieu comment procéder pour obtenir les données désirées : il est essentiel de bien prendre en considération le matériel biologique le pesticide et l'interaction entre les deux.

D'une manière générale nous avons vu qu'on choisira de préférence de se rapprocher au mieux des conditions d'application pratique des traitements sur des structures de populations telles qu'elles se présentent naturellement. Ce n'est que si ces conditions sont respectées que l'on obtiendra des résultats fiables permettant par exemple d'obtenir des corrélations entre tel niveau de résistance et un échec pratique de traitement.

**RÉSUMÉ.** Une nouvelle législation européenne va se substituer aux règles françaises actuellement en vigueur en ce qui concerne les autorisations de vente des produits phytosanitaires. Pour les effets secondaires sur les ennemis des ravageurs, la définition des épreuves toxicologiques est en cours, notamment au sein de l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique). Le groupe de travail "Pesticides et Organismes Utiles" de cette organisation a élaboré un schéma séquentiel d'évaluation de la toxicité des produits, adapté à plusieurs espèces. Cette méthodologie servira de base à la prochaine législation européenne, mais des interrogations techniques subsistent quant à la faisabilité et la validité des tests. La réglementation dans ce domaine est donc encore en phase de mise au point.

Le recours aux produits phytosanitaires reste la principale voie de protection des cultures, bien que le nombre de situations parasitaires pour lesquelles on dispose de solutions biologiques, biotechniques ou agronomiques s'accroisse significativement.

Parallèlement, la prise en considération des effets néfastes des traitements chimiques sur la faune auxiliaire, tant prédateurs et parasitoïdes que pollinisateurs, est déjà ancienne (Benassy et al 1964). Mais si la difficulté de combattre les ravageurs sans le malin dans la culture des facteurs de régulation est apparue clairement (exemples bien connus des pucerons ou des acariens phytophages sur diverses cultures, ou du psyle du pommier), c'est encore essentiellement au niveau de la recherche et des préconisations de nouvelles stratégies de protection des cultures qu'est envisagée l'étude de la toxicité des pesticides sur les antagonistes des ravageurs. La récente directive européenne concernant la mise sur le marché des produits phytochimiques (91/414/CEE du 15 juillet 1991), prévoyant des tests sur les auxiliaires pour chaque homologation, se traduira à ce titre par l'extension, à tous les pays de la communauté, de dispositions déjà en vigueur chez certains de nos voisins (Allemagne, Pays Bas, Angleterre). Nous présentons ici un aperçu des réflexions engagées au niveau européen pour les études de toxicité sur auxiliaires.

#### APPROCHES ÉCOLOGIQUES

Plusieurs groupes de travail, principalement au sein de l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique), ont contribué à la définition de méthodologies d'expérimentation en vergers (Steiner 1975), vigne (Boness et al, 1982), cultures protégées, ou grandes cultures (Japon 1987). Les améliorations apportées à la méthode de Steiner en vergers ont permis de proposer un test standardisé pour l'étude des effets à court terme des pesticides (CEB, 1982).

Une méthodologie d'évaluation des effets à moyen terme des pesticides en vergers est en cours de développement, pour prendre en compte la restauration des populations après les traitements et surtout l'effet des matières actives à action différée tels les Régulateurs de Croissance des Insectes (Reboullet 1988). Un dispositif analogue est évalué également en grandes cultures. Ce test en culture réalisé selon les pratiques agricoles offre une bonne représentation des conséquences d'interventions chimiques sur des systèmes parasitaires complexes, et constitue de ce fait l'étape ultime de l'expérimentation. Il implique toutefois souvent, pour les études d'effets à moyen terme, des dispositifs lourds en grandes parcelles échuant pour des raisons pratiques les randomisations de traitement, et sont dans ce cas non conformes aux directives pour les essais d'évaluation biologique (OEPP 1990). La fluctuation des facteurs abiotiques auxquels ils sont soumis, et surtout l'irrégularité numérique et spécifique des populations naturelles d'auxiliaires limitent leur reproductibilité et nécessiteraient leur répétition dans le temps et dans l'espace si ces tests devaient intervenir seuls dans la décision de classement d'un produit.

Des tests de nature non plus écologique mais toxicologique, standardisés et reproductibles, sont donc mis en oeuvre pour définir précisément l'action d'un produit sur un organisme auxiliaire. Les principes de ces tests, s'inscrivant dans une procédure séquentielle, ont été définis lors de la création du groupe OILB "Pesticides et organismes utiles" (Franz 1975).

Atelier d'entomologie Appliquée : Lutte Intégrée Contre les Ravageurs des Cultures.  
31 Mars et 1er Avril 1993. Montpellier.  
CIRAD-CA, URCA.

Department of Commerce in Madrid. At the time of my departure, it was the general feeling that every effort would be made by Spanish agricultural interests to place obstacles during the coming year in the way of favorable conditions for export of many American products to Spain.

---

PRESIDENT A. F. BURGESS: The next paper is by J. J. Culver.

### THE VALUE OF THE DRY SUBSTITUTES FOR LIQUID LIME SULPHUR AS A CONTROL FOR SAN JOSE SCALE

By J. J. CULVER, *Vienna, Va.*

(Withdrawn for Publication Elsewhere)

---

PRESIDENT A. F. BURGESS: We will take up the first paper on the afternoon program, by W. S. Abbott.

### A METHOD OF COMPUTING THE EFFECTIVENESS OF AN INSECTICIDE

By W. S. ABBOTT, *Bureau of Entomology, United States Department of Agriculture*

In computing the effectiveness of insecticides, when an actual count of the living and dead insects in both the treated and untreated plats, or checks, is available, it is obvious that the insects which die from natural causes must be considered. Just what weight should be given to this factor, and how its value is to be determined, seem to vary with the individual experimenter.

Perhaps the most common method is to subtract the percentage of dead in the check plat from the corresponding figure for the treated plat and call the remainder the effectiveness of the treatment. If the mortality in the check is very low this method may be fairly satisfactory, but if, for example, the check shows 50 per cent dead and the treated plat 98 per cent dead, then the effectiveness, determined by this method, would be only 48 per cent.

This matter of the proper evaluation of the check is not of great consequence when a series of tests is based on one check, but becomes highly important when experiments based on different checks are compared.

For the last five years the entomologists of the Insecticide and Fungicide Board have been carrying on a rather extensive series of experiments with treatments against the San Jose scale, and in attempting to

compare their results a method of computing what may be termed the "per cent control" has been developed.

This method is based on the following line of reasoning:

1. The difference between the percentage of living scales in the untreated check and the percentage of living scales in the treated plat gives the percentage of the original number actually killed by the treatment.

2. When a certain number of scales, as for example 20 per cent, is found to have died from natural causes, it logically follows that only 80 per cent of the original infestation was living and could have been killed by the treatment applied.

3. Since only 80 per cent of the insects could have been killed by the spray the "per cent control" would be determined by comparing the number actually killed with the number of *living* scales in the check. This may be reduced to a simple formula as follows:

Let  $X$  = the per cent living in the check.

Let  $Y$  = the per cent living in the treated plat.

Then  $X - Y$  = the per cent killed by the treatment.

And the per cent killed by the treatment ( $X - Y$ ) divided by the per cent living in the check ( $X$ ) gives the control, or expressed by an equation,

$$\frac{X - Y}{X} \times 100 = \text{per cent control.}$$

The following examples show how this method works out in actual practice.

Example	Per cent living in check $X$	Per cent living in treated plat $Y$	Difference ( $X - Y$ )	Significance of Difference	Per cent control $\frac{X - Y}{X}$
1	45.0 ± 1.5	19.5 ± 1.07	25.5 ± 1.84	13.8	56.6 ± 2.77
2	45.0 ± 1.5	2.4 ± 0.22	42.6 ± 1.51	28.2	94.6 ± .52
3	83.8 ± 0.8	30.3 ± 1.38	53.5 ± 1.59	33.8	63.8 ± 1.67
4	83.8 ± 0.8	3.6 ± 0.37	80.2 ± .88	91.1	95.7 ± .44

The "per cent control" secured by the use of this formula is obviously no more accurate or significant than the original data on which it is based. It should therefore not be used until the reliability of the figures for the percentage of dead in the check and treated plats has been carefully considered. This can be done by computing the probable error for each set of counts and then determining the significance of the difference between the two counts.

It is generally considered by biometricians that, when the difference between the results obtained in two experiments is more than three times its probable error, the results are significant, that is, if the quo-

tient obtained when the difference is divided by its probable error is over three we can say that the difference is probably not due to chance but to the treatments applied.

The probable errors for X, Y, and X—Y are given in the table above.

These typical cases show how a high or low check affects the "per cent control," and it should be noted that when a high percentage of efficiency is found the "per cent control" does not materially reduce this figure.

As far as I am aware this method has not been generally used by entomologists, but it seems to offer a reliable means for comparing results when several series of experiments have been carried on, each based on a different check.

---

MR. PHILIP GARMAN: I would like to ask Professor Abbott if there is any difference in the formulae used for computing the probable error by different persons experimenting with this kind of work.

MR. W. S. ABBOTT: I think Mr. Hartzell in a paper before this Society last year gave three different formulae, and there are different methods.

MR. PHILIP GARMAN: How do you decide which method is the proper one to use?

MR. W. S. ABBOTT: It is up to the entomologist to make the choice for himself.

PRESIDENT A. F. BURGESS: The next paper is by Albert Hartzell and F. H. Lathrop.

## AN INVESTIGATION OF SULFUR AS AN INSECTICIDE<sup>1</sup>

By ALBERT HARTZELL and F. H. LATHROP

### SUMMARY

The toxicity of sulfur and some of its compounds was tested under laboratory and field conditions. Atmospheres containing the volatile products of lime-sulfur were found to produce lethal effects on San Jose scale (*Aspidiotus perniciosus*), especially on the young. Tests on the covers of this species indicate that they are very slightly, if at all, soluble in lime-sulfur and the common wax solvents such as benzene, xylene and turpentine.

Three new sulfur insecticides were invented during the progress of this investigation. (1) Carbon disulfide-sulfur emulsion was made by emulsifying soap and water with carbon disulfide containing dissolved sulfur. Promising results were obtained

<sup>1</sup>Conducted under the direction of The Crop Protection Institute, as a part of a project financed jointly by the Freeport Sulphur Company, the Texas Gulf Sulphur Company, and the Union Sulphur Company.

CUANTIFICACION TOXICOLOGICA DE *Bacillus thuringiensis*, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO. Jorge Ibarra y Teresa de León. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.F.N., Unidad Irapuato Apartado Postal 629, 36500 Irapuato, Gto.

El efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre los insectos susceptibles sólo podrá ser medido cuantitativamente mediante bioensayo. El objetivo final de un bioensayo con *Bacillus thuringiensis* es la estimación de la C.L.<sub>50</sub>, como parámetro estadístico que refleja, dentro de ciertos niveles de probabilidad, el nivel de toxicidad de la preparación probada. En el presente trabajo se enumeran los diferentes pasos a seguir para la elaboración de un bioensayo estadísticamente válido, y cuáles son sus fundamentos.

Primeramente, es necesario tener claro el concepto de "bioensayo". El bioensayo se puede definir como: cualquier método que mida alguna propiedad de un material, en términos de respuesta biológica. Es decir, el bioensayo toma a los organismos vivos como aparatos de medición, y establece el parámetro biológico que utilizará (mortalidad, longevidad, fertilidad, crecimiento, etc.) para relacionar el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo. En el terreno toxicológico, el fenómeno causal es siempre un agente deletéreo y el efecto normalmente es la mortalidad o algún otro daño biológico. Este es el caso de los bioensayos donde se prueban los efectos de diversas preparaciones de *Bacillus thuringiensis*, sobre determinadas especies de insectos. El efecto se mide en términos de mortalidad, como si fuera un insecticida químico.

Los bioensayos con *Bacillus thuringiensis* pueden perseguir 3 objetivos diferentes, a saber: a) determinación de la eficiencia relativa de una cepa nueva o transformada, un producto de fermentación, o los cristales puros (Davidson, 1982), sobre una población de insectos; b) determinación de la susceptibilidad de diferentes razas o especies de insectos a una cepa estándar de *Bacillus thuringiensis*; y c) cuantificación de la actividad de los productos de fermentación de *Bacillus thuringiensis*, como método de estandarización de los productos comerciales.

El bioensayo con *Bacillus thuringiensis* se basa en la hipótesis farmacológica, la cual establece que un individuo manifestará el efecto medido, al administrarle una dosis determinada del fármaco en prueba; que dicha dosificación variará de un individuo a otro; y que el efecto sobre una población de individuos mostrará límites mínimos y máximos de dosificación. En otras palabras, el efecto de una dosis sólo podrá ser válido si se mide sobre una población homogénea. La dosificación mostrará un umbral en el que la dosis mínima de ese umbral causará el efecto deseado a un mínimo de la población probada, mientras que la dosis máxima de ese umbral causará el efecto esperado a un máximo de la población. Esto implica que si se desea establecer una relación entre las dosis probadas y la mortalidad causada por las preparaciones de *Bacillus thuringiensis*, cada dosis deberá probarse con una población representativa de individuos tal, que refleje los efectos reales de la  $\delta$ -endotoxina. De esta forma, los datos podrán ser analizados estadísticamente y se podrá estimar un parámetro estadístico que represente, con un nivel de probabilidad dado, la toxicidad de la preparación en prueba.

Las múltiples experiencias para correlacionar las diferentes

dosis de una prueba con los porcentajes de mortalidad, nos muestran que éstas no son del tipo lineal simple. Esto es de esperarse, basados en la ley de Weber-Fechner, que nos explica que: el cambio en magnitud o intensidad de una respuesta biológica es proporcional no al cambio aritmético del estímulo, sino a su logaritmo. Teóricamente, la relación entre dosis y porcentaje de mortalidad se establece por una línea sigmoidéa extendida; es decir, la sección de la curva correspondiente a las dosis máximas y a las mortalidades máximas se extiende a la derecha, provocando que la curva se muestre asimétrica. Un primer intento de regularizar la curva se obtiene al transformar las dosis probadas en el bioensayo a logaritmos. Si bien el resultado sigue siendo una curva sigmoidéa, ésta se hace simétrica en sus regiones asintóticas.

Ahora bien, una curva sigmoidéa simétrica también representa la respuesta acumulada de una población con distribución normal. En otras palabras, la distribución de mortalidad de una población puede ahora representarse por el área contenida en una campana o curva de Gausse, en donde el 50% del área (la media) coincide con el punto medio de la curva y con 0 (cero) unidades de desviación estándar. En una distribución normal, las desviaciones estándar se distribuyen aritméticamente en la abscisa de la curva, representando, cada una de ellas, una área específica de ésta. Así, el 0 (cero) representa al 50% del área, el 1 al 84.1%, el -1 al 15.9 %, el 2 al 97.7%, el -2 al 2.3%, y así sucesivamente; en otras palabras hay una representación aritmética de los porcentajes de mortalidad, lo cual significa que la curvatura causada por la distribución de la mortalidad puede transformarse en una línea recta si a su vez se transforman los porcentajes en unidades de desviaciones estándar.

Es conveniente aclarar que las mortalidades menores al 50% estarían representadas por unidades negativas, por lo cual, arbitrariamente Bliss (1934) sugirió "correr" la escala 5 unidades, de tal forma que el 0 (cero) correspondiera a 5, el 1 al 6, el 2 al 7, el -1 al 4, el -2 al 3, y así sucesivamente. Con esta modificación, convenientemente se evita trabajar con números negativos. Estas unidades son las llamadas unidades Probit, y al análisis de regresión entre las dosis transformadas a logaritmos (opcional) y los porcentajes de mortalidad transformados a unidades Probit, se le conoce como análisis Probit, el cual relaciona las variables mediante la técnica de máxima similitud por pruebas de bondad de ajuste consecutivas, en vez de utilizar la técnica de mínimos cuadrados, propia de un análisis de regresión normal. Esto es por el hecho de trabajar con unidades discretas (muerto o no muerto), en vez de continuas. Asimismo, la técnica de máxima similitud asegura la obtención de estimadores consistentes (i.e. C.L.<sub>90</sub>'s), no está propensa a los sesgos y, sobre todo, es eficiente en muestras grandes y pequeñas. De esta forma se establece una relación lineal simple entre log dosis-Probit (Finney, 1952).

Aunque existen otros tipos de análisis estadísticos para establecer la relación dosis-mortalidad, el análisis Probit es, definitivamente, el más socorrido. De ahí que se hayan desarrollado programas simples, ya sea para calculadoras programables o bien para microcomputadoras, que facilitan grandemente el procesamiento de los datos. Los principales parámetros resultantes de un análisis Probit son: el estimador medio o D.L.<sub>50</sub>, sus límites fiduciales, el valor de ji-cuadrada, y la pendiente de la línea de regresión. Al estimador medio

generalmente se le conoce como Dosis Letal Media o sea la dosis que mata al 50% de la población. Sin embargo, una dosis representa una determinada cantidad del elemento tóxico que es administrado (por cualquier vía) a cada uno de los individuos (Hughes y Wood, 1981). Normalmente, ésta no es la técnica que se sigue cuando se prueban productos de *Bacillus thuringiensis*, ya que los individuos comúnmente se exponen a concentraciones del producto (ya sea agregado a las dietas o al medio, como es el caso de las larvas de mosquitos) (W.H.O., 1981), desconociendo la cantidad específica que ingiere cada individuo. Es por eso que, en las pruebas con *Bacillus thuringiensis*, normalmente no se habla de D.L.<sub>50</sub>'s sino, más bien, de C.L.<sub>50</sub>'s o Concentraciones Letales Medias. Aunque poco usados en pruebas con *Bacillus thuringiensis*, otros estimadores medios son los T.L.<sub>50</sub>'s o Tiempos Letales Medios los cuales, en vez de dosis o concentraciones, las relaciones se establecen entre la mortalidad y el tiempo transcurrido entre la administración del tóxico y la muerte del individuo; ésto se utiliza como parámetro adicional para medir la eficiencia del elemento tóxico. También la D.E.<sub>50</sub> o Dosis Efectiva Media es un estimador medio que mide ya no la mortalidad sino algún efecto deletéreo causado por el tóxico (ej. reducción de fertilidad, decremento de peso, desarrollo lento, etc.). Este parámetro no se utiliza en pruebas con *Bacillus thuringiensis*.

La importancia de los estimadores medios en el análisis Probit radica en sus límites fiduciales. Estos representan el rango o intervalo del estimador, a un determinado nivel de probabilidad (generalmente 95% o 99%). Obviamente, entre más estrecho sea este intervalo, más preciso y confiable es el estimador. La gráfica de los límites fiduciales (valores máximos y mínimos) de todos los valores de la línea de regresión no se observa como líneas paralelas de ésta, sino que se estrechan exactamente en el punto del estimador medio, para luego diverger en sus extremos. En otras palabras, de todos los puntos que conforman la línea de regresión, es la C.L.<sub>50</sub> (o D.L.<sub>50</sub>) el estimador más preciso, en cuanto que presenta los límites fiduciales más estrechos. De ahí que se escoja al estimador medio como el parámetro estadístico que representa el nivel de toxicidad de algún agente, sobre la población y bajo las condiciones probadas. Es por esa razón que las pruebas con *Bacillus thuringiensis* tienen como principal objetivo, estimar la C.L.<sub>50</sub> de cada preparación, como punto de comparación entre cepas, entre productos de fermentación, entre cristales puros, etc. (Ibarra y Federici, 1986), y es este parámetro el que determina si una cepa es más o menos tóxica que los estándares, si una población de insectos desarrolló o no resistencia a algún producto a base de *Bacillus thuringiensis*, o si a un lote de producción debe agregársele mayor o menor cantidad de ingredientes inertes, para estandarizar el nivel de actividad de una formulación comercial.

Es importante aclarar que la mayoría de los productos comerciales a base de *Bacillus thuringiensis*, presentan en su etiqueta la potencia del producto en Unidades Internacionales de Toxicidad (U.I.T. o T.I.U., en inglés). Esta es una convención que se establece mediante la comparación de un producto estándar, ampliamente conocido y caracterizado, cuyo efecto tóxico es muy estable, y al que se le han asignado, arbitrariamente, un número determinado de U.I.T./mg (Dulmage, 1981). Este preparado estándar se prueba paralelamente al producto de un lote de fermentación, para luego comparar ambas C.L.<sub>50</sub>'s

mediante la fórmula:

$$\text{Potencia de la muestra} = \frac{\text{C.L.}_{50} \text{ del Estándar}}{\text{C.L.}_{50} \text{ de la Muestra}} \times \text{Potencia del Estándar}$$

(U.I.T./mg) (U.I.T./mg)

Los estándares más conocidos son: E1, HD-1, I.F.S.82, M-1, a los cuales se les han adscrito U.I.T. que van desde 1,000 hasta 18,000. En cada caso se especifican las condiciones bajo las cuales se debe llevar a cabo el bioensayo y la especie (algunas veces hasta la raza) del insecto sobre el cual se ha estandarizado el procedimiento. La principal limitante a esta convención es que el lote estándar eventualmente se termina y debe ser substituido por otro, al cual deberá asignársele una nueva potencia, invalidando o al menos limitando su comparación con potencias calculadas anteriormente. De ahí que muchos investigadores prefieran comparar las cepas estándar, preparadas bajo las mismas condiciones que las cepas o muestras a probar, y comparar directamente las C.L.<sub>50</sub>'s. Una modificación que confiere más precisión a la comparación es por medio del uso de cristales puros, tanto del estándar como de las cepas a prueba.

Existen dos parámetros adicionales, importantes en el análisis Probit: la ji-cuadrada y la pendiente. La primera es un resultado de la técnica de máxima similitud, ya que se basa en una serie consecutiva de pruebas de bondad de ajuste de los datos observados contra los datos esperados, representados por los puntos que conforman la línea de regresión. Esto hace que el valor de la ji-cuadrada refleje el nivel de similitud entre los datos obtenidos del bioensayo y los representados por la línea o teóricos. Es evidente que entre mayor sea esta similitud, más confiables serán los estimadores medios provenientes del análisis. Un valor mínimo de ji-cuadrada expresa una máxima similitud. En lo referente al valor de la pendiente de la línea de regresión, éste nos refleja, adicional a la magnitud del efecto de la variable independiente (log dosis), la adecuación del rango de dosis probada. En otras palabras, si la pendiente es muy baja, debemos estrechar el rango de dosis y de esta forma distribuir los diferentes niveles de mortalidad más equilibradamente; por el contrario, si la pendiente es muy alta, esto significa que el efecto está concentrado en un espacio muy pequeño de la gráfica y es necesario ampliar el rango de dosis, con los mismos propósitos descritos anteriormente. El problema principal en estos casos es cuando se prueban formulaciones de *Bacillus thuringiensis* cuyas proporciones del ingrediente activo son muy bajas. Aquí, las mortalidades están distribuidas en rangos de dosis muy amplios, debido a que la magnitud del efecto se reduce con la formulación, provocando que la pendiente de la línea de regresión sea mínima.

Existen diversos requerimientos que deben ser cubiertos por los bioensayos con *Bacillus thuringiensis*: a) la mortalidad natural en los individuos testigo debe ser igual o menor al 10%; b) el valor de la ji-cuadrada, en un bioensayo de 6 dosis, debe ser menor o igual a 5; c) de una serie de 6 dosis probadas, por lo menos 2 deben ser mayores o menores a la C.L.<sub>50</sub> estimada; d) por lo menos 4 de un total de 6 dosis probadas deben causar una mortalidad de entre 10 y 90%; e) el valor de la pendiente de la línea de regresión debe estar entre 1.5 y 6; f) el cociente entre el límite fiducial mayor (p= 0.95) y el



menor debe ser menor o igual a 2; g) deben hacerse por lo menos 3 repeticiones válidas, por separado; h) el coeficiente de variación de la C.L.<sub>50</sub> media (de las repeticiones) debe ser igual o menor a 20% (Ibarra y Federici, 1987).

En el primer caso, la mortalidad natural no debe exceder ciertos límites, ya que ésta influiría en la medición del efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis*. Mediante la fórmula de Abbott, es posible corregir las mortalidades debidas al agente tóxico, proporcionalmente a la mortalidad natural registrada en el testigo. Sin embargo, por razones obvias, el ajuste tiene sus límites. En el segundo caso, el valor máximo de una ji-cuadrada aceptable se establece en 5, con 6 dosis en el bioensayo y 2 grados de libertad. Si bien es una decisión un tanto arbitraria, establece un grado de similitud mínima entre los datos observados y los esperados. Esto implica que este valor máximo tenga cierto grado de flexibilidad. El tercer requerimiento es el llamado Equilibrio del Rango de Dosis, el cual propone como bioensayo óptimo aquel cuya C.L.<sub>50</sub> estimada está localizada exactamente en el centro del rango de dosis probado. Su flexibilidad está limitada dentro de las 3/5 partes centrales del rango. El cuarto requerimiento es la llamada Amplitud del Rango de Dosis, la cual propone como bioensayo óptimo aquel cuyas mortalidades se registran entre 10 y 90%. Esto se debe a que el 0 o el 100% de mortalidad (toxicidad nula o total), no tienen valor de causa a efecto, además de que no existen valores, en unidades Probit, para estas mortalidades y es necesario hacer una serie de ajustes para efectuar el análisis. Su flexibilidad se limita a que al menos debe haber 4 dosis dentro de este rango de mortalidad.

En el quinto requerimiento, como ya se explicó con anterioridad, se pretende equilibrar el rango de dosis y la distribución de la mortalidad. Los valores mínimo y máximo propuestos son sugeribles, por lo que tienen cierto grado de flexibilidad. Similarmente, los límites fiduciales no deben ser muy amplios, ya que esto restaría precisión y confianza al estimador medio. Consecuentemente, se establece un límite de 2 en el cociente entre los límites fiduciales, con cierto grado de flexibilidad. En lo que respecta al número de repeticiones, no es necesario enfatizar la importancia de probar el efecto de un agente tóxico un número determinado de veces, con el objeto de observar la consistencia de los resultados. Una forma directa de medir la repetibilidad de éstos es por medio del Coeficiente de Variación (C.V.), el cual representa el último requerimiento estadístico de los bioensayos. Este mide la variación entre las C.L.<sub>50</sub>'s de las repeticiones en porcentajes. Entre mayor sea el C.V., mayor será la variación entre las observaciones, y menor la confiabilidad y precisión de la C.L.<sub>50</sub> media. El 20% recomendado permite una variación intermedia, acorde a la consistencia de la respuesta que podríamos esperar de una población de individuos, probados bajo condiciones controladas. Para tener una mejor idea de este parámetro, un 40% se considera un C.V. aceptable para la media de una serie de repeticiones provenientes de un experimento de campo; por otro lado, el C.V. puede bajar hasta un 5% cuando se mide la variación entre observaciones repetidas, hechas en aparatos de laboratorio. El criterio para rechazar o aceptar un bioensayo va a depender de los requerimientos enlistados anteriormente y de la experiencia del experimentador. Si uno de los requerimientos cae fuera de los límites aceptables, pero el resto de ellos indican un buen nivel, el experimentador deberá decidir sobre la importancia

del parámetro que se extralimitó y su amplitud de inaceptabilidad.

A pesar de que la variación inherente de los organismos de prueba es la causa principal de la variación de los estimadores medios, la estandarización de las condiciones de bioensayo es fundamental para obtener resultados uniformes. Es por eso que, como se explicó anteriormente, la comparación de los resultados sólo puede hacerse efectiva si los bioensayos se desarrollan bajo las mismas condiciones. A continuación se enlistan algunos de los principales factores que pueden influenciar los resultados de un bioensayo: la preparación del material tóxico, su almacenamiento, el estadio del insecto sobre el que se prueba, su instar, el tipo de dieta, el volumen de la dieta, el recipiente de bioensayo, la técnica para integrar el material tóxico a la dieta, el número de insectos por repetición, el número de dosis probadas en un bioensayo, el factor de dilución entre las dosis, el tiempo de exposición a la preparación de *Bacillus thuringiensis*, si se manejan dosis o concentraciones, y los factores físicos ambientales (temperatura, humedad, fotoperíodo) (McLaughling et al., 1984).

En el caso de un bioensayo con *Bacillus thuringiensis* en el cual se desconoce el rango de actividad de la preparación en prueba, como es el caso de la caracterización toxicológica de una nueva cepa, es recomendable iniciar los bioensayos con 2 o 3 dosis cuyo factor de dilución entre ellas sea de 0.1. Este tipo de bioensayos selecciona casi en forma cualitativa si un producto es o no es tóxico. Además, determina el rango de actividad o "ventana biológica" del producto en prueba. El siguiente paso consiste en probar el producto en una forma más cuantitativa, utilizando 4 o 5 dosis con un factor de dilución de 0.5 entre ellas. Este tipo de bioensayos son preliminares y aún no es posible estimar eficientemente los parámetros necesarios, mediante análisis Probit; sin embargo, nos da una estimación burda de la C.L.<sub>50</sub>, la cual se utiliza para calcular el rango de dosis del siguiente paso. Este consiste en una serie de bioensayos de 6 dosis con un factor de dilución de entre 0.6 y 0.8 (dependiendo del comportamiento de los rangos de dosis probados). Este tipo de bioensayos son los utilizados para estimar los parámetros requeridos, mediante análisis Probit.

En conclusión, la cuantificación toxicológica de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* sigue una metodología muy similar a la de cualquier insecticida químico, con la salvedad de que estamos refiriéndonos a un agente biológico, con todos los beneficios que ésto implica. Debemos hacer notar que, mientras la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* no se sintetice *in vitro*, los productos a base de esta bacteria deberán ser considerados agentes de control biológico. Sin embargo, no creemos que sea éste el caso del uso de la  $\delta$ -endotoxina en plantas transgénicas. Creemos que este (hasta ahora) sofisticado tipo de control, debe circunscribirse al ámbito del control varietal. En el presente capítulo sólo se cubrieron los fundamentos de la cuantificación toxicológica de *Bacillus thuringiensis*. Al interesado en ampliar y practicar dichas técnicas deberá referirse a la literatura más detallada, y específica al trabajo que planea llevar a cabo.

#### LITERATURA CITADA

Bliss, C.I. 1934. The method of probits. Science 79: 38-39.

- Davidson, E.W. 1982. Purification and properties of soluble cytoplasmatic toxin from the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* strain 1593. *J. Invert. Pathol.* 39:6-9.
- Dulmage, H.T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. Chapter 11, pp. 193-222. In: *Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980*, H.D. Burges (ed.). Academic Press, Inc., New York.
- Finney, D.J. 1952. *Probit analysis*. 2nd. ed. Cambridge Univ. Press. 318 pp.
- Hughes, P.R. and H.A. Wood. 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *J. Invert. Pathol.* 37:154-159.
- Ibarra, J.E. and B.A. Federici. 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion form the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 165:527-533.
- Ibarra, J.E. and B.A. Federici. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Ass.* 3:187-192.
- McLaughling, R.E., H.T. Dulmage, R. Alls, T.L. Couch, D.A. Dame, I.M. Hall, R.I. Rose and P.L. Versoi. 1984. U.S. standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30:26-29.
- World Health Organization. 1981. Bioassay protocol for *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Unpublished document. TDR/VEC-SWG(5)/81.3.

## Método gráfico para estimar la línea de respuesta

### A. Ajuste gráfico de la ecuación de log-dosis versus unidades de probit.

1. Convierta las dosis en unidades logarítmicas.
2. Calcule la proporción de muertes ( $r = \text{Número de muertes} / n$ )
3. Calcule la proporción de muertes en el testigo ( $c$ ) y haga la corrección de  $r$ , utilizando la fórmula de Abbott:

$$r_c = \frac{(r-c)}{(1-c)}$$

4. Haga la conversión de proporción de muertes corregidas ( $r_c$ ) a unidades de probit. Utilice el cuadro 1.
5. En el papel cuadrado, dibuje los puntos correspondientes a cada log-dosis (x axis) y probit (y axis).
6. Con regla, dibuje una línea que pase cerca a la mayoría de los puntos.
7. Lea las coordenadas de 2 puntos de la línea, y calcule la pendiente:

$$b = -$$

$$= \frac{\text{probit } b - \text{probit } a}{\text{dosis } b - \text{dosis } a}$$

8. Lea la dosis ( $m$ ) correspondiente al probit 5.

9. Calcule la línea de respuesta propuesta

$$Y = 5 + b(x-m)$$

$$Y = 5 + bx - bm$$

$$Y = 5 - bm + bx$$

$$Y = a + bx \quad (a = 5 - bm)$$

### B. Cálculos de $\chi^2$ prueba de bondad de ajuste:

1. Calcule el número corregido de muertes ( $Ob$ ):

$$Ob = nr_c$$

2. Calcule el valor de probit estimado ( $Y$ ) para cada dosis, utilizando la ecuación derivada de la gráfica.

$$Y = a + bx$$

3. Haga la conversión de probit estimado a proporción esperada ( $P$ ) de muertes. Utilice el cuadro 1.

4. Calcule el número esperado ( $E$ ) de muertes:

$$E = pn$$

5. Calcule las desviaciones entre el número observado y número esperado.

$$Ob - E$$

6. Calcule las contribuciones de cada observación al valor de  $\chi^2$ .

$$\frac{(Ob-E)^2}{nP(1-P)}$$

7. Calcule el valor de  $\chi^2$  (sumatoria de los valores previamente calculados). Los grados de libertad son el número de dosis - 2.
8. Del cuadro 2, lea el valor de  $\chi^2$  correspondiente al nivel de probabilidad deseado y número de grados de libertad. Si el  $\chi^2$  es menor que el valor obtenido en el cuadro, esto quiere decir que la línea estimada es una buena aproximación de la respuesta.

C. Precisión aproximada del valor de  $CL_{50}$  estimado. (error estandar y limite fiducial)

1. Los valores altos o bajos (cerca de 0 y 1) de proporciones de muertes obtenidos con organismos tiene menos precisión que los más cercanos a  $P = 0.5$ . El factor de peso ( $w$ ) se utiliza para ajustar la importancia de las observaciones según el valor de  $P$  al calcular el error estandar de  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$ .
2. Lea el valor de  $w$  que corresponde a cada  $Y$  del cuadro 3.
3. Multiplique el valor por  $n$  (se distribuye en  $n$ ).
4. Haga la sumatoria de  $nw$ . Este es el valor de  $S_{nw}$ .
5. Calcule el error estandar de  $DL_{50}$  ( $s_m$ ).

$$s_m = \frac{1}{b\sqrt{S_{nw}}}$$

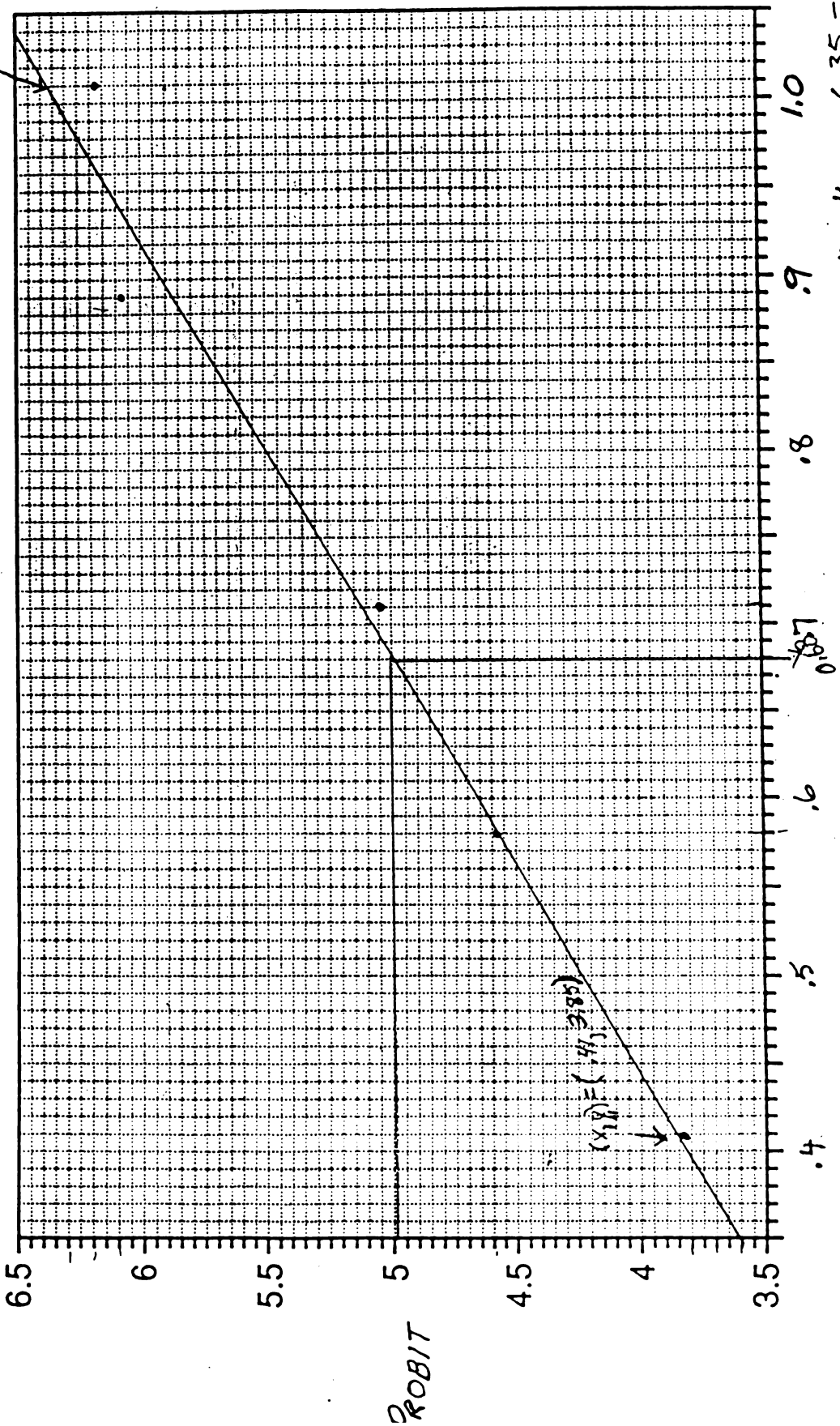
6. De la distribución normal, se nota que la probabilidad de que el estimado de  $DL_{50}$  sea menor que  $1.96(s_m)$  es 2.5% y la de que sea mayor que  $1.96(s_m)$  es 2.5%. Existe una probabilidad (se llama *probabilidad fiducial*) del 95% que el valor verdadero de  $DL_{50}$  esté entre  $m+1.96(s_m)$  y  $m-1.96(s_m)$ . Calcule estos limites fiduciales.

Calculos de línea de respuesta,  $\chi^2$ , y medidas de variabilidad de la DL<sub>50</sub>

Dosis	log (dosis)	Número total (n)	Número muertos (r)	proporción corregida (r <sub>c</sub> )	Valor de probit observado	Número corregido de muertes (Ob)	Valor de probit estimado (Y)	Proporción esperada de muertes (P)	Número esperado de muertes (E)	desviación (Ob-E)	$\frac{(Ob-E)^2}{nP(1-P)}$ $\chi^2$	Factor de peso (w)	nw
2.6	0.41	50	6	0.12	3.82	6	3.85	0.125	6.25	-0.25	0.011	0.370	18.5
3.8	0.58	48	16	0.33	4.56	16	4.55	0.327	15.70	0.30	0.009	0.601	32.3
5.1	0.71	46	24	0.52	5.05	24	5.12	0.548	25.21	-1.21	0.128	0.634	29.2
7.7	0.89	49	42	0.86	6.08	42	5.87	0.808	35.59	2.41	0.764	0.503	24.6
10.2	1.01	50	44	0.88	6.18	44	6.35	0.912	45.60	-1.6	0.638	0.336	16.8
Testigo	0.0	49	0	C = 0.00						$\chi^2 =$	1.55	$S_{nw} =$	121.4

Ecuación	$b = (6.35 - 3.85) / (1.01 - 0.41) = 4.17$ $m = 0.686$ $Y = 5 + 4.17(x - 0.686)$ $Y = 2.14 + 4.17x$	$\chi^2$ g.l. = 3 $\chi^2$ , (probabilidad = 0.05, g.l. = 3) = 7.8 $\chi^2$ observado < $\chi^2$ del cuadro No significativo al nivel de 5%
$S_m$	$S_m = 1 / (4.17 \sqrt{121.4}) = 0.022$ $\text{Log}(DL_{50}) = 0.686 \pm 0.022$ $DL_{50} = 4.85$	limites fiduciales (bajo, alto) = (0.643, 0.729) (log-dosis) (bajo, alto) = (4.40, 5.36) (dosis)

$(x_2, y_2) = (1.01, 6.35)$



$$b = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{6.35 - 3.85}{1.01 - 0.41} = 4.16$$

Log (OCSIS)

$m - x_1 = \dots = 0.683$

Dosis	Log (dosis)	Número total (n)	Número muertos	Proporción muertos (r)	Proporción corregida (r/c)	Número corregido de muertos (Ob)	Valor de probit observado	Valor de probit estimado (Y)	Proporción esperada de muertos (P)	Número esperado de muertos (E)	desviación (OB-E)	$\frac{(Ob-E)^2}{n_P(1-P)}$	Factor de peso (W)	nW
				(1)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	
Tes-Tigo				C=						$\chi^2=$	1.55	S(nv)=		

Ecuación:  $Y = S + b(x-m)$   
 $Y =$  unidades de probit  
 $b =$  pendiente  
 $x = \log_{10}(\text{dosis})$   
 $m =$  respuesta mediana



- and its sampling error in bio-assay. III. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, 29, 257-62.
- Winder, C. V. (1947). Misuse of 'deduced ratios' in the estimation of median effective doses. *Nature, Lond.*, 159, 883.
- Worcester, J. and Wilson, E. B. (1943). A table determining LD50 or the 50% end-point. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, 29, 207-12.
- Wright, S. (1926). A frequency curve adapted to variation in percentage occurrence. *J. Amer. Statist. Ass.*, 21, 162-78.
- Yugoslav Typhoid Commission (1962). A controlled field trial of the effectiveness of phenol and alcohol typhoid vaccines. *Bull. Wild Health Org.*, 26, 357-69.

soy los decimales Cuadro I Transformación de porcentajes a unidades de probit.  
Table I Transformation of percentages to probits

%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	3	4	5
0	—	1.9098	2.1218	2.2522	2.3479	2.4242	2.4879	2.5427	2.5911	2.6344					
1	2.6737	2.7096	2.7429	2.7738	2.8027	2.8299	2.8556	2.8799	2.9031	2.9251					
2	2.9463	2.9665	2.9859	3.0046	3.0226	3.0400	3.0569	3.0732	3.0890	3.1043					
3	3.1192	3.1337	3.1478	3.1616	3.1750	3.1881	3.2009	3.2134	3.2256	3.2376					
4	3.2493	3.2608	3.2721	3.2831	3.2940	3.3046	3.3151	3.3253	3.3354	3.3454					
5	3.3551	3.3648	3.3742	3.3836	3.3928	3.4018	3.4107	3.4195	3.4282	3.4368	9	18	27	36	45
6	3.4452	3.4536	3.4618	3.4699	3.4780	3.4859	3.4937	3.5015	3.5091	3.5167	8	16	24	32	40
7	3.5242	3.5316	3.5389	3.5462	3.5534	3.5605	3.5675	3.5745	3.5813	3.5882	7	14	21	28	36
8	3.5949	3.6016	3.6083	3.6148	3.6213	3.6278	3.6342	3.6405	3.6468	3.6531	6	13	19	26	32
9	3.6592	3.6654	3.6715	3.6775	3.6835	3.6894	3.6953	3.7012	3.7070	3.7127	6	12	18	24	30
10	3.7184	3.7241	3.7298	3.7354	3.7409	3.7464	3.7519	3.7574	3.7628	3.7681	6	11	17	22	28
11	3.7735	3.7788	3.7840	3.7893	3.7945	3.7996	3.8048	3.8099	3.8150	3.8200	5	10	16	21	26
12	3.8250	3.8300	3.8350	3.8399	3.8448	3.8497	3.8545	3.8593	3.8641	3.8689	5	10	15	20	24
13	3.8736	3.8783	3.8830	3.8877	3.8923	3.8969	3.9015	3.9061	3.9107	3.9152	5	9	14	18	23
14	3.9197	3.9242	3.9286	3.9331	3.9375	3.9419	3.9463	3.9506	3.9550	3.9593	4	9	13	18	22
15	3.9636	3.9678	3.9721	3.9763	3.9806	3.9848	3.9890	3.9931	3.9973	4.0014	4	8	13	17	21
16	4.0055	4.0096	4.0137	4.0178	4.0218	4.0259	4.0299	4.0339	4.0379	4.0419	4	8	12	16	20
17	4.0458	4.0498	4.0537	4.0576	4.0615	4.0654	4.0693	4.0731	4.0770	4.0808	4	8	12	16	19
18	4.0846	4.0884	4.0922	4.0960	4.0998	4.1035	4.1073	4.1110	4.1147	4.1184	4	8	11	15	19
19	4.1221	4.1258	4.1295	4.1331	4.1367	4.1404	4.1440	4.1476	4.1512	4.1548	4	7	11	15	18
20	4.1584	4.1619	4.1655	4.1690	4.1726	4.1761	4.1796	4.1831	4.1866	4.1901	4	7	11	14	18
21	4.1936	4.1970	4.2005	4.2039	4.2074	4.2108	4.2142	4.2176	4.2210	4.2244	3	7	10	14	17
22	4.2278	4.2312	4.2345	4.2379	4.2412	4.2446	4.2479	4.2512	4.2546	4.2579	3	7	10	13	17
23	4.2612	4.2644	4.2677	4.2710	4.2743	4.2775	4.2808	4.2840	4.2872	4.2905	3	7	10	13	16
24	4.2937	4.2969	4.3001	4.3033	4.3065	4.3097	4.3129	4.3160	4.3192	4.3224	3	6	10	13	16

Table I (cont.)

CAGE

%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	3	4	5
25	4.3255	4.3287	4.3318	4.3349	4.3380	4.3412	4.3443	4.3474	4.3505	4.3536	3	6	9	12	16
26	4.3567	4.3597	4.3628	4.3659	4.3689	4.3720	4.3750	4.3781	4.3811	4.3842	3	6	9	12	15
27	4.3872	4.3902	4.3932	4.3962	4.3992	4.4022	4.4052	4.4082	4.4112	4.4142	3	6	9	12	15
28	4.4172	4.4201	4.4231	4.4260	4.4290	4.4319	4.4349	4.4378	4.4408	4.4437	3	6	9	12	15
29	4.4466	4.4495	4.4524	4.4554	4.4583	4.4612	4.4641	4.4670	4.4698	4.4727	3	6	9	12	14
30	4.4756	4.4785	4.4813	4.4842	4.4871	4.4899	4.4928	4.4956	4.4985	4.5013	3	6	9	11	14
31	4.5041	4.5070	4.5098	4.5126	4.5155	4.5183	4.5211	4.5239	4.5267	4.5295	3	6	8	11	14
32	4.5323	4.5351	4.5379	4.5407	4.5435	4.5462	4.5490	4.5518	4.5546	4.5573	3	6	8	11	14
33	4.5601	4.5628	4.5656	4.5684	4.5711	4.5739	4.5766	4.5793	4.5821	4.5848	3	5	8	11	14
34	4.5875	4.5903	4.5930	4.5957	4.5984	4.6011	4.6039	4.6066	4.6093	4.6120	3	5	8	11	14
35	4.6147	4.6174	4.6201	4.6228	4.6255	4.6281	4.6308	4.6335	4.6362	4.6389	3	5	8	11	13
36	4.6415	4.6442	4.6469	4.6495	4.6522	4.6549	4.6575	4.6602	4.6628	4.6655	3	5	8	11	13
37	4.6681	4.6708	4.6734	4.6761	4.6787	4.6814	4.6840	4.6866	4.6893	4.6919	3	5	8	11	13
38	4.6945	4.6971	4.6998	4.7024	4.7050	4.7076	4.7102	4.7129	4.7155	4.7181	3	5	8	10	13
39	4.7207	4.7233	4.7259	4.7285	4.7311	4.7337	4.7363	4.7389	4.7415	4.7441	3	5	8	10	13
40	4.7467	4.7492	4.7518	4.7544	4.7570	4.7596	4.7622	4.7647	4.7673	4.7699	3	5	8	10	13
41	4.7725	4.7750	4.7776	4.7802	4.7827	4.7853	4.7879	4.7904	4.7930	4.7955	3	5	8	10	13
42	4.7981	4.8007	4.8032	4.8058	4.8083	4.8109	4.8134	4.8160	4.8185	4.8211	3	5	8	10	13
43	4.8236	4.8262	4.8287	4.8313	4.8338	4.8363	4.8389	4.8414	4.8440	4.8465	3	5	8	10	13
44	4.8490	4.8516	4.8541	4.8566	4.8592	4.8617	4.8642	4.8668	4.8693	4.8718	3	5	8	10	13
45	4.8743	4.8769	4.8794	4.8819	4.8844	4.8870	4.8895	4.8920	4.8945	4.8970	3	5	8	10	13
46	4.8996	4.9021	4.9046	4.9071	4.9096	4.9122	4.9147	4.9172	4.9197	4.9222	3	5	8	10	13
47	4.9247	4.9272	4.9298	4.9323	4.9348	4.9373	4.9398	4.9423	4.9448	4.9473	3	5	8	10	13
48	4.9498	4.9524	4.9549	4.9574	4.9599	4.9624	4.9649	4.9674	4.9699	4.9724	3	5	8	10	13
49	4.9749	4.9774	4.9799	4.9825	4.9850	4.9875	4.9900	4.9925	4.9950	4.9975	3	5	8	10	13
50	5.0000	5.0025	5.0050	5.0075	5.0100	5.0125	5.0150	5.0175	5.0201	5.0226	3	5	8	10	13
51	5.0251	5.0276	5.0301	5.0326	5.0351	5.0376	5.0401	5.0426	5.0451	5.0476	3	5	8	10	13
52	5.0502	5.0527	5.0552	5.0577	5.0602	5.0627	5.0652	5.0677	5.0702	5.0728	3	5	8	10	13
53	5.0753	5.0778	5.0803	5.0828	5.0853	5.0878	5.0904	5.0929	5.0954	5.0979	3	5	8	10	13
54	5.1004	5.1030	5.1055	5.1080	5.1105	5.1130	5.1156	5.1181	5.1206	5.1231	3	5	8	10	13
55	5.1257	5.1282	5.1307	5.1332	5.1358	5.1383	5.1408	5.1434	5.1459	5.1484	3	5	8	10	13
56	5.1510	5.1535	5.1560	5.1586	5.1611	5.1637	5.1662	5.1687	5.1713	5.1738	3	5	8	10	13
57	5.1764	5.1789	5.1815	5.1840	5.1866	5.1891	5.1917	5.1942	5.1968	5.1993	3	5	8	10	13
58	5.2019	5.2045	5.2070	5.2096	5.2121	5.2147	5.2173	5.2198	5.2224	5.2250	3	5	8	10	13
59	5.2275	5.2301	5.2327	5.2353	5.2378	5.2404	5.2430	5.2456	5.2482	5.2508	3	5	8	10	13
60	5.2533	5.2559	5.2585	5.2611	5.2637	5.2663	5.2689	5.2715	5.2741	5.2767	3	5	8	10	13
61	5.2793	5.2819	5.2845	5.2871	5.2898	5.2924	5.2950	5.2976	5.3002	5.3029	3	5	8	10	13
62	5.3055	5.3081	5.3107	5.3134	5.3160	5.3186	5.3213	5.3239	5.3266	5.3292	3	5	8	11	13
63	5.3319	5.3345	5.3372	5.3398	5.3425	5.3451	5.3478	5.3505	5.3531	5.3558	3	5	8	11	13
64	5.3585	5.3611	5.3638	5.3665	5.3692	5.3719	5.3745	5.3772	5.3799	5.3826	3	5	8	11	13
65	5.3853	5.3880	5.3907	5.3934	5.3961	5.3989	5.4016	5.4043	5.4070	5.4097	3	5	8	11	14
66	5.4125	5.4152	5.4179	5.4207	5.4234	5.4261	5.4289	5.4316	5.4344	5.4372	3	5	8	11	14
67	5.4399	5.4427	5.4454	5.4482	5.4510	5.4538	5.4565	5.4593	5.4621	5.4649	3	6	8	11	14
68	5.4677	5.4705	5.4733	5.4761	5.4789	5.4817	5.4845	5.4874	5.4902	5.4930	3	6	8	11	14
69	5.4959	5.4987	5.5015	5.5044	5.5072	5.5101	5.5129	5.5158	5.5187	5.5215	3	6	9	11	14
70	5.5244	5.5273	5.5302	5.5330	5.5369	5.5388	5.5417	5.5446	5.5476	5.5505	3	6	9	12	14
71	5.5534	5.5563	5.5592	5.5622	5.5651	5.5681	5.5710	5.5740	5.5769	5.5799	3	6	9	12	15
72	5.5828	5.5858	5.5888	5.5918	5.5948	5.5978	5.6008	5.6038	5.6068	5.6098	3	6	9	12	15
73	5.6128	5.6158	5.6189	5.6219	5.6250	5.6280	5.6311	5.6341	5.6372	5.6403	3	6	9	12	15
74	5.6433	5.6464	5.6495	5.6526	5.6557	5.6588	5.6620	5.6651	5.6682	5.6713	3	6	9	12	16

Table I (cont.)

202

%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	3	4	5
75	5.6745	5.6776	5.6808	5.6840	5.6871	5.6903	5.6935	5.6967	5.6999	5.7031	3	6	10	13	16
76	5.7063	5.7095	5.7128	5.7160	5.7192	5.7225	5.7257	5.7290	5.7323	5.7356	3	7	10	13	16
77	5.7388	5.7421	5.7454	5.7488	5.7521	5.7554	5.7588	5.7621	5.7655	5.7688	3	7	10	13	17
78	5.7722	5.7756	5.7790	5.7824	5.7858	5.7892	5.7926	5.7961	5.7995	5.8030	3	7	10	14	17
79	5.8064	5.8099	5.8134	5.8169	5.8204	5.8239	5.8274	5.8310	5.8345	5.8381	4	7	11	14	18
80	5.8416	5.8452	5.8488	5.8524	5.8560	5.8596	5.8633	5.8669	5.8705	5.8742	4	7	11	14	18
81	5.8779	5.8816	5.8853	5.8890	5.8927	5.8965	5.9002	5.9040	5.9078	5.9116	4	7	11	15	19
82	5.9154	5.9192	5.9230	5.9269	5.9307	5.9346	5.9385	5.9424	5.9463	5.9502	4	8	12	15	19
83	5.9542	5.9581	5.9621	5.9661	5.9701	5.9741	5.9782	5.9822	5.9863	5.9904	4	8	12	16	20
84	5.9945	5.9986	6.0027	6.0069	6.0110	6.0152	6.0194	6.0237	6.0279	6.0322	4	8	13	17	21
85	6.0364	6.0407	6.0450	6.0494	6.0537	6.0581	6.0625	6.0669	6.0714	6.0758	4	9	13	18	22
86	6.0803	6.0848	6.0893	6.0939	6.0985	6.1031	6.1077	6.1123	6.1170	6.1217	5	9	14	18	23
87	6.1264	6.1311	6.1359	6.1407	6.1455	6.1503	6.1552	6.1601	6.1650	6.1700	5	10	15	19	24
88	6.1750	6.1800	6.1850	6.1901	6.1952	6.2004	6.2056	6.2107	6.2160	6.2212	5	10	15	21	26
89	6.2265	6.2319	6.2372	6.2426	6.2481	6.2536	6.2591	6.2646	6.2702	6.2759	5	11	16	22	27
90	6.2816	6.2873	6.2930	6.2988	6.3047	6.3106	6.3165	6.3225	6.3285	6.3346	6	12	18	24	29
91	6.3408	6.3469	6.3532	6.3595	6.3658	6.3722	6.3787	6.3852	6.3917	6.3984	6	13	19	26	32
92	6.4051	6.4118	6.4187	6.4255	6.4325	6.4395	6.4466	6.4538	6.4611	6.4684	7	14	21	28	35
93	6.4758	6.4833	6.4909	6.4985	6.5063	6.5141	6.5220	6.5301	6.5382	6.5464	8	16	24	31	39
94	6.5548	6.5632	6.5718	6.5805	6.5893	6.5982	6.6072	6.6164	6.6258	6.6352	9	18	27	36	45
95	6.6449	6.6546	6.6646	6.6747	6.6849	6.6954	6.7060	6.7169	6.7279	6.7392					
	97	100	101	102	105	106	109	110	113	115					
96	6.7507	6.7624	6.7744	6.7866	6.7991	6.8119	6.8250	6.8384	6.8522	6.8663					
	117	120	122	125	128	131	134	138	141	145					
97	6.8808	6.8957	6.9110	6.9268	6.9431	6.9600	6.9774	6.9954	7.0141	7.0335					
	149	153	158	163	169	174	180	187	194	202					

%	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	1	2	3	4	5
98.0	7.0537	7.0558	7.0579	7.0600	7.0621	7.0642	7.0663	7.0684	7.0706	7.0727	2	4	6	8	11
98.1	7.0749	7.0770	7.0792	7.0814	7.0836	7.0858	7.0880	7.0902	7.0924	7.0947	2	4	7	9	11
98.2	7.0969	7.0992	7.1015	7.1038	7.1061	7.1084	7.1107	7.1130	7.1154	7.1177	2	5	7	9	12
98.3	7.1201	7.1224	7.1248	7.1272	7.1297	7.1321	7.1345	7.1370	7.1394	7.1419	2	5	7	10	12
98.4	7.1444	7.1469	7.1494	7.1520	7.1545	7.1571	7.1596	7.1622	7.1648	7.1675	3	5	8	10	13
98.5	7.1701	7.1727	7.1754	7.1781	7.1808	7.1835	7.1862	7.1890	7.1917	7.1945	3	5	8	11	14
98.6	7.1973	7.2001	7.2029	7.2058	7.2086	7.2115	7.2144	7.2173	7.2203	7.2232	3	6	9	12	14
98.7	7.2262	7.2292	7.2322	7.2353	7.2383	7.2414	7.2445	7.2476	7.2508	7.2539	3	6	9	12	15
98.8	7.2571	7.2603	7.2636	7.2668	7.2701	7.2734	7.2768	7.2801	7.2835	7.2869	3	7	10	13	17
98.9	7.2904	7.2938	7.2973	7.3009	7.3044	7.3080	7.3116	7.3152	7.3189	7.3226	4	7	11	14	18
99.0	7.3263	7.3301	7.3339	7.3378	7.3416	7.3455	7.3495	7.3535	7.3575	7.3615	4	8	12	16	20
99.1	7.3656	7.3698	7.3739	7.3781	7.3824	7.3867	7.3911	7.3954	7.3999	7.4044	4	9	13	17	22
99.2	7.4089	7.4135	7.4181	7.4228	7.4276	7.4324	7.4372	7.4422	7.4471	7.4522	5	10	14	19	24
99.3	7.4573	7.4624	7.4677	7.4730	7.4783	7.4838	7.4893	7.4949	7.5006	7.5063	5	11	16	22	27
99.4	7.5121	7.5181	7.5241	7.5302	7.5364	7.5427	7.5491	7.5556	7.5622	7.5690	6	13	19	25	32
99.5	7.5758	7.5828	7.5899	7.5972	7.6045	7.6121	7.6197	7.6276	7.6356	7.6437					
99.6	7.6521	7.6606	7.6693	7.6783	7.6874	7.6968	7.7065	7.7164	7.7266	7.7370					
99.7	7.7478	7.7589	7.7703	7.7822	7.7944	7.8070	7.8202	7.8338	7.8480	7.8627					
99.8	7.8782	7.8943	7.9112	7.9290	7.9478	7.9677	7.9889	8.0115	8.0357	8.0618					
99.9	8.0902	8.1214	8.1559	8.1947	8.2389	8.2905	8.3528	8.4316	8.5401	8.7190					

I am indebted to Professor R. A. Fisher and Dr F. Yates, and also to Messrs Oliver and Boyd, Ltd. of Edinburgh, for permission to reprint Table I from Table IX of their book *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*.

# Cuadro 2 Distribución de $\chi^2$

Table VII Distribution of  $\chi^2$

Degrees of freedom	Probability								
	.90	.70	.50	.30	.10	.05	.02	.01	.001
1	.016	.15	.45	1.1	2.7	3.8	5.4	6.6	10.8
2	.21	.71	1.4	2.4	4.6	6.0	7.8	9.2	13.8
3	.58	1.4	2.4	3.7	6.3	7.8	9.8	11.3	16.3
4	1.1	2.2	3.4	4.9	7.8	9.5	11.7	13.3	18.5
5	1.6	3.0	4.4	6.1	9.2	11.1	13.4	15.1	20.5
6	2.2	3.8	5.3	7.2	10.6	12.6	15.0	16.8	22.5
7	2.8	4.7	6.3	8.4	12.0	14.1	16.6	18.5	24.3
8	3.5	5.5	7.3	9.5	13.4	15.5	18.2	20.1	26.1
9	4.2	6.4	8.3	10.7	14.7	16.9	19.7	21.7	27.9
10	4.9	7.3	9.3	11.8	16.0	18.3	21.2	23.2	29.6
12	6.3	9.0	11.3	14.0	18.5	21.0	24.1	26.2	32.9
14	7.8	10.8	13.3	16.2	21.1	23.7	26.9	29.1	36.1
16	9.3	12.6	15.3	18.4	23.5	26.3	29.6	32.0	39.3
18	10.9	14.4	17.3	20.6	26.0	28.9	32.3	34.8	42.3
20	12.4	16.3	19.3	22.8	28.4	31.4	35.0	37.6	45.3
22	14.0	18.1	21.3	24.9	30.8	33.9	37.7	40.3	48.3
24	15.7	19.9	23.3	27.1	33.2	36.4	40.3	43.0	51.2
26	17.3	21.8	25.3	29.2	35.6	38.9	42.9	45.6	54.1
28	18.9	23.6	27.3	31.4	37.9	41.3	45.4	48.3	56.9
30	20.6	25.5	29.3	33.5	40.3	43.8	48.0	50.9	59.7

The table  
 gives  
 the  
 values of  
 the  
 distribution  
 of  
 the  
 chi-square  
 distribution  
 for  
 various  
 degrees  
 of  
 freedom  
 and  
 various  
 probabilities.

## Cuadro 3.

Table 3.5 The weighting coefficient,  $w = Z^2/PQ$

Y	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.003	0.005	0.006	0.008	0.011
2	0.015	0.019	0.025	0.031	0.040	0.050	0.062	0.076	0.092	0.110
3	0.131	0.154	0.180	0.208	0.238	0.269	0.302	0.336	0.370	0.405
4	0.439	0.471	0.503	0.532	0.558	0.581	0.601	0.616	0.627	0.634
5	0.637	0.634	0.627	0.616	0.601	0.581	0.558	0.532	0.503	0.471
6	0.439	0.405	0.370	0.336	0.302	0.269	0.238	0.208	0.180	0.154
7	0.131	0.110	0.092	0.076	0.062	0.050	0.040	0.031	0.025	0.019
8	0.015	0.011	0.008	0.006	0.005	0.003	0.002	0.002	0.001	0.001

## Cálculos de dosis o concentración

### 1. Conversión entre unidades

Peso	Volumen
1 g = 1000 mg (miligramos por gramo)	1 l = 1000 ml (mililitros por litro)
1 mg = 1000 µg (microgramos por miligramo)	1 ml = 1000 µl. (microlitros por litro)

ppm = partes por millón

1 mililitro de agua pesa 1 gramo.

1 µl / l = 1 ppm (volumen sobre volumen)

1 mg / l = 1 ppm (peso por sobre volumen)

1 µg / ml = 1 ppm (peso sobre volumen)

ppm = µl / l = mg / l = µg / ml

### 2. Concentración

Generalmente, la concentración se mide en unidades de partes por millón, expresado en términos de volumen por volumen (líquidos) o peso por peso (polvos mojables). Para llegar a la concentración correcta es necesario calcular el peso o volumen de producto (o solución más concentrado) requerido para mezclar con el volumen de agua u otro solvente.

A. Concentración de ingrediente activo (I.a.) en el producto. Este generalmente se expresa en porcentaje en la etiqueta.

- Ej. Carbaryl 50 PM tiene 50% I. a.  
Decis 2.5 EC tiene 2.5% I. a. = 25 gr I.a. / litro  
Dipel 2x tiene 6.4% I.a.

Conversión de % I. a. en ppm:

$$\text{Carbaryl: } \frac{50 \text{ partes I.a.}}{100 \text{ partes producto}} = \frac{500\,000}{1\,000\,000} = 500,000 \text{ ppm}$$

$$\text{Decis: } \frac{2.5 \text{ partes I.a.}}{100 \text{ partes producto}} = \frac{25\,000}{1\,000\,000} = 25,000 \text{ ppm}$$

## ANEXO 1

ppm/ (mg/ml) / %

Los ppm se utilizan para medir porciones muy pequeñas de la fase sólida con respecto a la líquida.

Para transformar datos entre estas tres unidades de medidas al procedimiento es el siguiente:

1- Para pasar los datos a mg/ml, si se tiene g/ml.

Ej.:

0.1 g/100 ml, el 0.1 g se multiplica por 1000 y nos da 100 mg\100 ml.

2- Para pasar esta relación a ppm, se multiplican los mg. por 1000 y se dividen entre el número de ml.

Ej.:

100 mg/100 ml, se multiplica 100 mg por 1000, lo que nos da 100000, se divide entre 100 ml, lo que nos da 1000 que serán los ppm.

3- Para pasar los ppm a porcentajes, los ppm se dividen entre 10000.

Ej.:

1000 ppm entre 10000 es igual a 0.1 %.

4- Para pasar los porcentajes a ppm es lo contrario, se multiplican por 10000.

Ej.:

0.1 % por 10000 nos da 1000 ppm.

5- Para pasar de litro a mililitro, se multiplica por mil.

6- Para pasar los mg a g, se dividen los mg entre 1000.

7- Para pasar los g a mg se multiplican los g por 1000.

Otros ejemplos:

1 mg\1000 ml = 1 ppm = 0.0001 %.

1 g/100 ml = 10000 ppm = 1 %.

0.001 g/100 ml = 1 mg/100 ml = 10 ppm = 0.001 %.

\* Una solución al 1% es igual a 10000 ppm y es igual a 1g/100ml.

Unidades de medidas:

MASA

- gramo g
- Kilogramo 1000 g
- Miligramo 0.001 g
- Microgramo 0.000001 g
- nanogramo 0.000000001 g

VOLUMEN

- litro lt
- mililitro 0.001 lt
- microlitro 0.000001 lt

1000  $\mu$ l = 1 ml

1000000  $\mu$ g = 1 g

1000  $\mu$ g = 1 mg

## Análisis de Datos por Regresión de Log-dosis versus Mortalidad en Unidades de Probit.

### 1. Curvas de dosis-respuesta

1.1 Forma de la curva típica. Si se toman unas muestras (al azar) de organismos y se exponen a una serie de dosis de un tóxico y se hace una gráfica de porcentajes de respuesta (porcentajes de muertes corregidos por mortalidad en el testigo) versus dosis, la curva que resulta generalmente tiene forma sigmoideal (como la letra S) y no simétrico (Fig. 1.1) La porción inferior (mano izquierda) de la curva generalmente es más corta que la superior (mano derecha), y el punto de inflexión de la curva está bajo el nivel de 50% mortalidad.

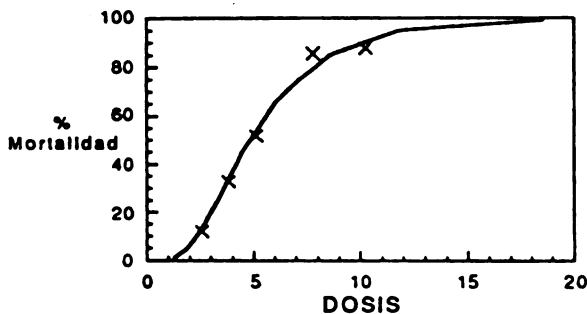


Figura 1.1 Curva de forma sigmoideal y no simétrica que señala la relación típica entre porcentaje de mortalidad y dosis.

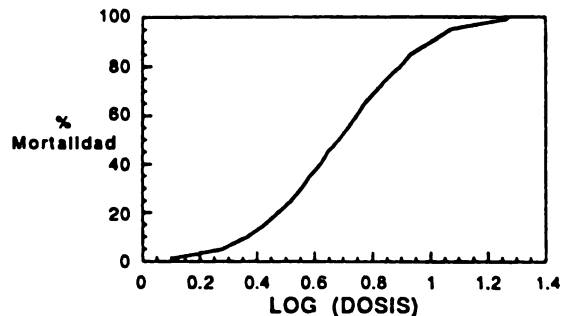


Figura 1.2 La misma curva pero con dosis en unidades logarítmicas

De esta curva, se pueden deducir varias dosis que producen el porcentaje de respuesta correspondiente: La dosis que produce mortalidad de  $K\%$  se llama dosis letal  $K$  o  $DL_K$ . Por ejemplo, las dosis que producen mortalidad de 30, 50, 80 o 90% se refieren como  $DL_{30}$ ,  $DL_{50}$ ,  $DL_{80}$ , y  $DL_{90}$ , respectivamente. La porción superior de la curva se acerca al nivel de 100%, pero nunca lo alcanza. Por eso, es imposible determinar una  $DL_{100}$ , la cuál no existe, teóricamente.



**1.2 Efecto de transformar dosis a unidades logarítmicas.** Si se hace una gráfica de porcentaje de mortalidad versus el logaritmo (base 10) de dosis (en vez de dosis), se obtiene una curva simétrica, con el punto de inflexión en el 50% de mortalidad (Fig. 1.2)

**1.3 Interpretación de la curva de log-dosis-mortalidad.** La curva de respuesta se puede interpretar en términos del concepto de *tolerancias individuales*. La tolerancia individual es una característica del propio individuo respecto al tóxico utilizado. La tolerancia es la dosis del tóxico inmediatamente por debajo de la suficiente para matar al organismo. Por ejemplo, si 65% de los organismos de una población mueren cuando se exponen a una dosis  $K_1$ , esto significa que el 65% tiene tolerancias individuales de menos de la dosis  $K_1$ . Con otra dosis  $K_2$ , que causa la muerte de 55% de los organismos, se puede decir lo mismo: el 55% tiene tolerancias individuales de menos de la dosis  $K_2$ . Lógicamente, entonces, el 10% de los organismos (65%-55%) tiene tolerancias individuales entre las dosis  $K_1$  y  $K_2$ . De esta forma, se puede determinar la distribución de tolerancia en una población de organismos.

**1.4 Distribución de log-tolerancia.** Las distribuciones de log-tolerancia son simétricas y por lo general, parecidas a la distribución normal. La Fig. 1.3 representa una distribución de frecuencias de log-tolerancia que corresponde a la curva de dosis-respuesta. Esta tiene una forma parecida a la distribución normal estandarizada (Fig. 1.4)

**1.5. Distribución normal.** La distribución normal es una distribución que describe la probabilidad de observar diferentes valores de respuesta en un experimento. Tiene dos parámetros:  $\mu$  (el promedio) y  $\sigma^2$  (la varianza). La curva normal estandarizada es la que tiene  $\mu = 0$  and  $\sigma^2 = 1$ . De la curva se puede determinar la probabilidad de obtener una observación entre  $-z < \mu < +z$  ( $z$  es la ordenada de la distribución). Si se sacaran muchas observaciones repetidas de la

población, unos 68% de éstas tendría valores entre  $-1\sigma$  y  $+1\sigma$ ; 95% de las observaciones caerían entre el intervalo de  $-2\sigma$  a  $+2\sigma$ . Estas dos cantidades se estiman con una muestra de tamaño  $n$ , en la cual  $x_i$  = valor de una observación,  $\bar{x}$  = el promedio (estimado de  $\mu$ ) y la desviación estandar cuadrada ( $s^2$ ; estimado de  $\sigma^2$ ) es:

$$s^2 = \sum_{i=0}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

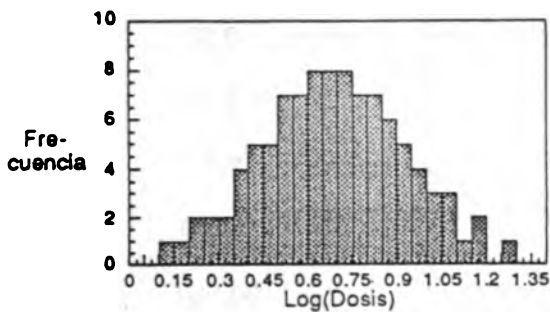


Fig. 1.3 Distribución de log-tolerancia

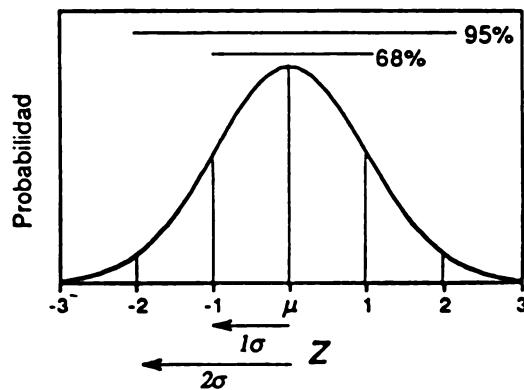


Fig. 1.4 Distribución normal estandarizada

### 1.6 Correspondencia entre desviaciones de la distribución normal

estandarizada y unidades de probit. La escala de probit se define en términos de distribución normal. Cada unidad de desviación es equivalente a una unidad de probit, más 5. Se señala la correspondencia entre la mortalidad proporcional, desviaciones de la distribución normal estandarizada, y unidades de probit en el cuadro 1.6. Esta transformación se hizo para que los valores (de probit) fueran todos positivos.

Cuadro 1.6. Comparación entre porcentaje de mortalidad, desviaciones de la distribución normal, y unidades de probit.

Mortalidad (porcentaje)	Desviaciones de la distribución normal ( $\sigma$ )	Unidades de probit
0.00	$-\infty$	-
0.14	-3	2
2.3	-2	3
15.9	-1	4
50.0	$\mu=0$	5
84.1	1	6
97.7	2	7
99.86	3	8
100.00	$+\infty$	-

La transformación de mortalidad proporcional a probites, junto con la transformación de dosis en unidades logarítmicas produce una respuesta lineal (Fig. 1.5).

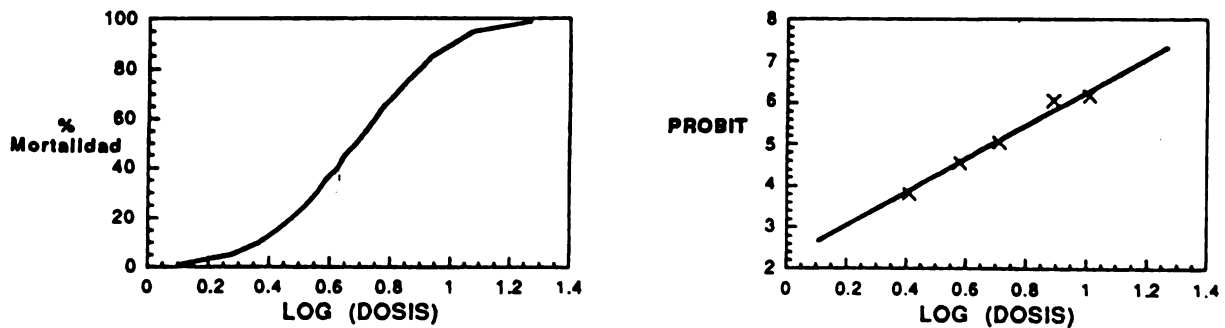


Figura 1.5 Efecto de transformar mortalidad proporcional en unidades de probit.

## 2. Análisis de la línea de respuesta.

**2.0 Ecuación de log dosis versus unidades de probit.** El objetivo del análisis es deducir la ecuación de respuesta y la fiabilidad de los parámetros estimados. La ecuación, escrito en términos de la distribución normal es:

$$Y = 5 + \frac{1}{\sigma}(x - \mu)$$

En esta ecuación,  $\mu$  = respuesta media;  $\sigma$  = desviación estandar (raíz cuadrada de la varianza);  $x$  = log(dosis); y  $Y$  = probit (mortalidad). Estas cantidades se pueden deducir de los datos experimentales. Generalmente, la ecuación se escribe así:

$$Y = \alpha + \beta x$$

en la cual:  $\alpha$  = el intercepto =  $5 - \frac{1}{\sigma}$ ;  $\beta$  = la pendiente de la línea =  $\frac{1}{\sigma}$ . Las dos formas de la ecuación son equivalentes. Note que la pendiente provee una indicación de la variabilidad de la respuesta. Cuanto más alta es la pendiente, menor es la varianza en respuesta al tóxico.

Con los parámetros de la recta deducidos ya, se puede calcular el  $DL_k$  o  $CL_k$  mediante la ecuación en terminos de  $x$ :

$$x = \frac{Y - \alpha}{\beta}$$

Por ejemplo, para calcular el  $DL_{50}$ , se sustituye  $Y$  por 5:

$$DL_{50} = \frac{5 - \alpha}{\beta}$$

**2.1 Métodos para deducir la línea de respuesta.** Existen dos métodos de deducción: deducción gráfica y cálculo aritmético por el método de probabilidad maximizada. Por deducción gráfica, se hace un cuadro de la respuesta a cada dosis en papel cuadriculado y se dibuja una línea aproximada con regla (ver el ejercicio). Mediante la comparación de los valores predichos por la línea y los puntos verdaderos determinados en el ensayo, se puede calcular una estadística de  $\chi^2$ . Con esta estadística, se puede averiguar si la línea es una buena representación de la

distribución teórica. También pueden calcularse los valores aproximados del error estandar de  $DL_{50}$  y los límites fiduciales (límites de confianza). Se debe considerar que estos valores no son más que aproximaciones brutas.

**2.2 Método de probabilidad maximizada.** Para obtener valores más confiables de los parámetros de la línea y errores de estimación asociados con los datos experimentales, se utiliza el método de *probabilidad maximizada*. Los cálculos son un poco complicados, y por eso sólo ofrecemos unas observaciones generales. Este método utiliza varios ciclos de cálculos (interacciones) para estimar la ecuación de la recta, y generalmente requiere una computadora para hacerlos. Es distinto del método de regresión lineal porque con regresión lineal, cada punto tiene peso igual en el análisis; es decir, cada observación aporta la misma cantidad de información. En cambio, el análisis de probit se basa en datos (proporciones diferentes de mortalidad) que aportan cantidades diferentes de información (pesos diferentes). Por tal motivo, hay que ajustar la regresión para tomar en cuenta los pesos diferentes de las observaciones. El peso de la observación depende del tamaño de la muestra ( $n$ ), de la mortalidad proporcional ( $p$ ) y de la mortalidad en el testigo ( $c$ ). El factor de peso ( $w$ ) se utiliza junto con  $n$  para estimar la línea de respuesta y errores asociados. El factor de peso se calcula así:

$$w = \frac{Z^2}{P(1-P)}$$

$Z$  es el valor de la desviación en la distribución normal (ver Fig. 1.4), la cual se calcula con la ecuación:

$$Z = (2\pi)^{1/2} \exp\left[-\frac{1}{2}(Y-5)^2\right]$$

Esta corrección refleja el hecho de que la mayor variabilidad binomial al estimar la mortalidad proporcional ocurre con  $P = 0.5$ . El valor de  $w$  es máximo cuando  $Y = 5$  y disminuye con valores de  $Y$  mayores o menores que 5.

### 3. Varianza de los valores de los parámetros y ajuste con el modelo de probit

**3.1 Fuentes de errores en la estimación.** Con cualquier método de estimación, es importante saber: 1) si el modelo estadístico provee una descripción adecuada de los datos, y 2) la precisión de los parámetros estimados. En análisis con el modelo de probit, se calculan 3 medidas de la confianza de los estimados: 1) Prueba de  $\chi^2$ , que es una prueba de ajuste de los datos con el modelo de probit, 2) Límites fiduciales de los estimados de  $CL_k$ , y 3) El error estandar de la pendiente (b).

**3.2 Prueba  $\chi^2$  de bondad de ajuste y heterogeneidad de los datos.** Después de estimar la línea de respuesta, se calcula el valor de  $\chi^2$ . Esta prueba compara las respuestas observadas con las esperadas de la ecuación. El valor de  $\chi^2$  (con grados de libertad = número de dosis -2) se compara con un cuadro de chi cuadrado para ver la probabilidad de que los datos se ajusten al modelo estadístico. Si el nivel de probabilidad de  $\chi^2 > 0.05$ , se considera que el modelo estadístico es válido.

Si la probabilidad de  $\chi^2 < 0.05$ , esto significa que el modelo de probit no es suficiente para explicar todas las fuentes de variabilidad presentes en los datos. En esta situación, se supone que existe heterogeneidad en los sujetos del bioensayo que causa mayor variabilidad en los resultados. Esta variabilidad puede presentarse por varias causas y puede hacer más difícil el cálculo de varianzas correctas. Muchas veces es necesario consultar una gráfica de los datos para determinar si el análisis de probit es apropiado.

¡un buen ajuste. 8

¿ otras fuentes de varianzas?   
 ¡también controladas!

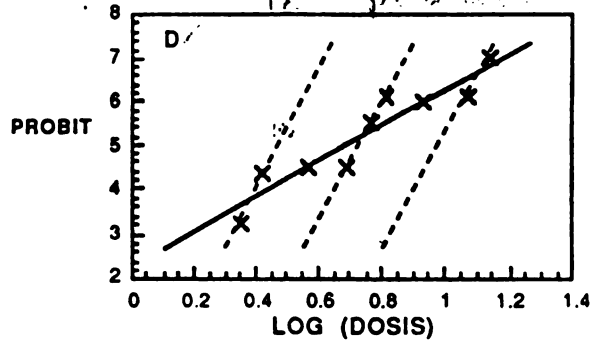
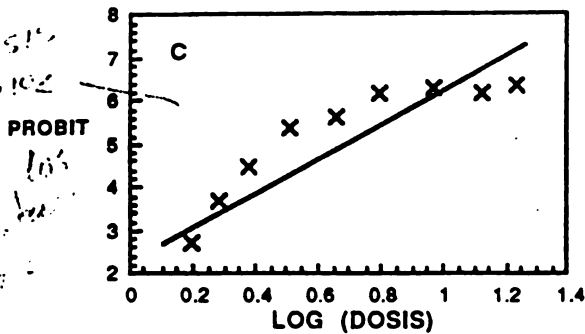
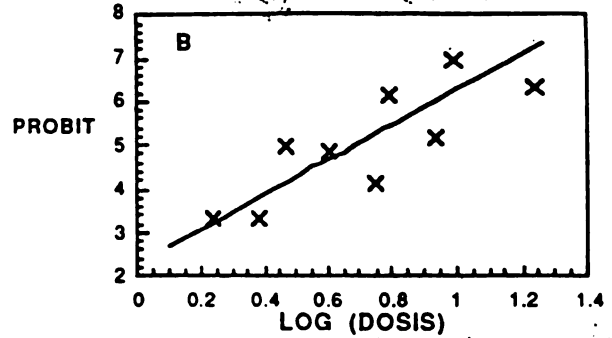
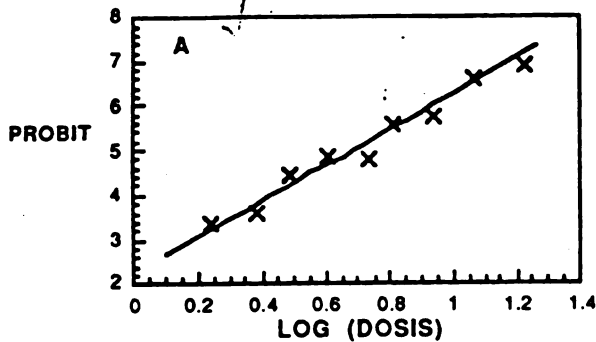


Figura 3.1 Patrones de respuesta que pueden causar valores elevados de  $\chi^2$ .

La figura 3.1 representa varias causas de valores elevados de  $\chi^2$ : A) Datos que dan un valor aceptable de  $\chi^2$ ; B) Mayor dispersión de los puntos alrededor de la línea, pero los puntos están distribuidos al azar; C) Respuesta no lineal, que indica que la transformación de probit no es el modelo correcto; D) Respuesta escalonada, que puede resultar en poblaciones compuestas de mezclas de individuos resistentes y susceptibles al tóxico.

Si únicamente hay mayor dispersión de puntos (Fig. 3.1B), las varianzas apropiadas pueden ser calculadas mediante la multiplicación de varianzas por el factor de heterogeneidad ( $h$ ):

$$h = \frac{\chi^2}{(k-2)}$$

( $k$  = número de dosis). Si hay otros problemas con los datos (Fig. 3.1C y D) no es apropiado usar este factor.

3.2 Límites fiduciales de  $CL_k$  y error estandar de la pendiente. Los detalles de como calcular límites fiduciales y error estandar de la pendiente por el método de *probabilidad maximizada* son complejos. Ambos dependen del grado de variabilidad de los datos, heterogeneidad, y del número de dosis utilizado en el bioensayo. Lo importante es entender lo que significan. Si decimos que existe un límite fiducial del 95%, esto significa que si repitiéramos el bioensayo muchas veces, el valor del  $CL_k$  o  $DL_k$  caería entre los límites bajos y altos en 95% de los ensayos. La fig. 3.2 señala la apariencia de los límites fiduciales y la variabilidad de la pendiente. Note que los límites son más angostos cerca al  $CL_{50}$  y más anchos en los puntos extremos de la línea.

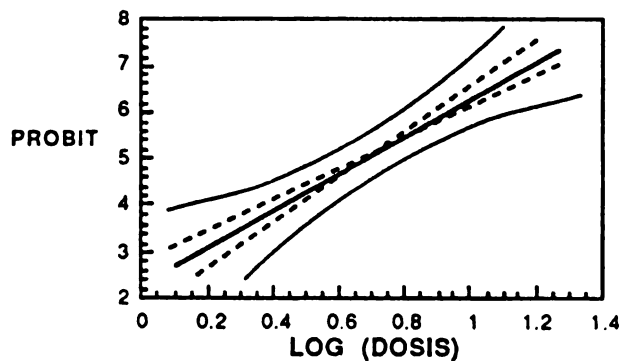


Fig. 3.2 Ilustración de los límites fiduciales y variabilidad de la pendiente de una regresión de probit.

### Referencias

Finney, D. J. 1971. *Probit analysis*. Prensa de la Universidad de Cambridge, Londres.

Hewlett, P. S. & R. L. Pleckett. 1974. The interpretation of quantal responses in biology. (*La interpretación de respuestas cuánticas biológicas*). Prensa Universitaria (University press), Baltimore, MD, EE UU.



# PROBIT ANÁLISIS

## TEXTO DE CLASE + PRÁCTICA:

- DL50
- TESTIGO
- "ABBOTT'S CORRECTION"
- TRANSFORMACIÓN LOGARÍTMICA
- TRANSFORMACIÓN PROBIT
- SPSS/PC+

## Introducción

¿ Que cantidad de plaguicida necesitamos para matar a una plaga ?

¿ Que es la relación entre la plaguicida (el estímulo) y la mortalidad (la respuesta) ?

En Sanidad Vegetal muchas veces estamos interesados en este tipo de preguntas. Lo que queremos es evaluar la potencia de un estímulo.

Se puede realizar experimentos en el laboratorio donde se observe el efecto de diferentes dosis de un producto sobre un organismo. Este tipo de experimentos se llama "bioensayo". Por ejemplo se puede realizar un bioensayo para comparar el efecto de Mamey y Neem sobre una población de *Plutella xylostella*.

Otros ejemplos de experimentos para estudiar la toxicidad de plaguicidas:

- Determinar cual dosis del producto tiene efecto. (DL50, DL90)
- Comparar la toxicidad de diferentes productos.
- Comparar la sensibilidad de diferentes organismos (por ejemplo comparar la sensibilidad de una plaga con la sensibilidad de sus parásitos).
- Determinar si existe resistencia en una plaga (comparar razas).

Vamos a ver como diseñar este tipo de bioensayo y como usar el "probit análisis" para analizar los datos

## Respuestas cuantales

Los efectos (o respuestas) que se mide en un experimento, se pueden dividir en dos tipos:

- gradual                    por ejemplo: cambios en peso o cambios en la reproducción
- quantal                    por ejemplo: muerto/vivo, dormido/desperto, enfermo/sano, germinado/no germinado

En bioensayos donde se usa probit análisis siempre se trata de respuestas cuantales (en Inglés: binomial response). Por ejemplo después de un tratamiento con insecticida un insecto puede ser muerto o vivo, no hay otra posibilidad. No todos los insectos van a tener la misma respuesta porque cada individuo tiene su propia sensibilidad. Por este vamos a aplicar diferentes niveles del estímulo a grupos de individuos. De cada individuo se determina si tiene la respuesta o si no tiene la respuesta. Para el grupo en su total resulta un porcentaje de respuesta (por ejemplo 78% muertos).

## Estudiar el efecto de un producto

Para indicar la toxicidad del producto o la sensibilidad del organismo normalmente se usa la DL50 (DL = Dosis Letal). La DL50 es la dosis que mata el 50% de una

población de un organismo. En experimentos con diferentes concentraciones se habla de CL50. Es importante decir que la DL50 es una característica de una población de organismos. No se puede hablar de una DL50 de un individuo.

### Bioensayo

En un bioensayo se divide una población en diferentes grupos de individuos. Se tiene que tomar en cuenta algunas condiciones importantes:

- La población que se usa en el experimento tiene que ser homogénea. Por ejemplo se usa insectos del mismo estadio de desarrollo, de la misma edad, etc.
- Se dividen los individuos de la población al azar en diferentes grupos.
- Se tiene que asegurar que las respuestas de los individuos en el experimento sean independientes. Por ejemplo hay dependencia cuando los individuos pueden producir químicos que influyen en la respuesta de otros individuos. Esto se puede realizar tratando cada individuo individual, pero si no es práctico se tiene que buscar otra alternativa.

Cada grupo se trata con un diferente dosis del producto. Normalmente se usa una serie exponencial de diferentes dosis.

Ejemplos: 1 , 3 , 9 , 27 , 81 , etc.  
0.01 , 0.1 , 1 , 10 , 100 , etc.

Después de un período fijo se toma los datos. De cada individuo se determina si tiene o si no tiene la respuesta. Por ejemplo 24 horas después del tratamiento determinar de cada insecto si esta muerto o vivo.

### Usar un testigo y hacer correcciones

En el experimento también se incluye grupos que no llevan tratamientos: los testigos. Esto es importante para saber si también hay respuesta sin usar el producto. Por ejemplo en un bioensayo de insecticida algunos insectos podrían morir por otras razones (edad, manejo durante el experimento, canibalismo, etc.)

La respuesta del testigo se usa para corregir las respuestas de los diferentes tratamientos (dosis). Se puede usar la siguiente formula que se llama "Abbott's correction".

$$\% \text{ respuesta corregida} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

a = porcentaje sin respuesta en el testigo

b = porcentaje sin respuesta en el tratamiento

**Ejemplo:**

En un bioensayo se usaron diferentes dosis de un insecticida y se observó como respuesta la mortalidad de insectos. En el testigo se observó una mortalidad de 7%. La respuesta en el testigo es 7%, entonces el porcentaje sin respuesta (a) es 93%. Con una de las dosis se observa una mortalidad de 70% entonces el porcentaje sin respuesta a este dosis (b) es 30%

Para calcular la mortalidad corregido con este dosis se usa la formula de Abbott:

$$\% \text{ mortalidad corregida} = \frac{93 - 30}{93} \times 100\% = 67.7\%$$

El efecto de este método de corrección con diferentes niveles de respuesta se puede observar en la Tabla 1.

**Tabla 1** Ejemplo de "Abbott's correction" con 7% mortalidad en el testigo

Mortalidad observada	Mortalidad corregida (7% mortalidad en testigo)
7	0.0
10	3.2
20	14.0
40	35.5
50	46.2
70	67.7
90	89.2
100	100

**Ejemplo de bioensayo**

Vamos a ver como se realiza un bioensayo usando un ejemplo para determinar el efecto de un insecticida sobre un insecto. Los datos en este ejemplo son artificial para mostrar claro el efecto de las transformaciones.

Supongamos que tenemos una población de insectos homogéneos. Al azar se toman 9 grupos de 100 insectos y cada grupo se trata con una dosis diferente. También se usa un

testigo (por ejemplo tratamiento con agua). Después de 24 horas se determina para cada dosis el porcentaje de mortalidad. Con la fórmula de Abbott se calcula la mortalidad corregida. La tabla 2 presenta los datos.

**Tabla 2a Ejemplo de datos: dosis, porcentaje mortalidad (corregido con "Abbott's correction")**

**Tabla 2b Datos transformados: log(dosis), probits mortalidad**

dosis	mortalidad corregido (%)
0.25	3
0.5	7
1	16
2	31
4	51
8	70
16	85
32	94
64	98

log(dosis)	mortalidad (probits)
-0.60206	3.12
-0.30103	3.52
0	4.01
0.30103	4.5
0.60206	5.03
0.90309	5.52
1.20412	6.04
1.50515	6.55
1.80618	7.05

En una figura, la curva dosis - mortalidad es una curva sigmoide asimétrica (sigmoide = con forma de S). Este forma de curva es típica para muchas relaciones del tipo dosis - respuesta. (Ver figura 1)

Esta curva sería suficiente para estimar la DL50 o sea la dosis donde 50% de la población va a morir (DL = Dosis Letal). Pero en la vida real, los datos en experimentos siempre tienen una variación. Para dibujar muy precisamente la forma de la curva necesitamos hacer muchas repeticiones con muchos diferentes dosis.

En el análisis probit se usa transformaciones de los datos para cambiar esta curva en una línea recta. Una recta es más fácil de construir

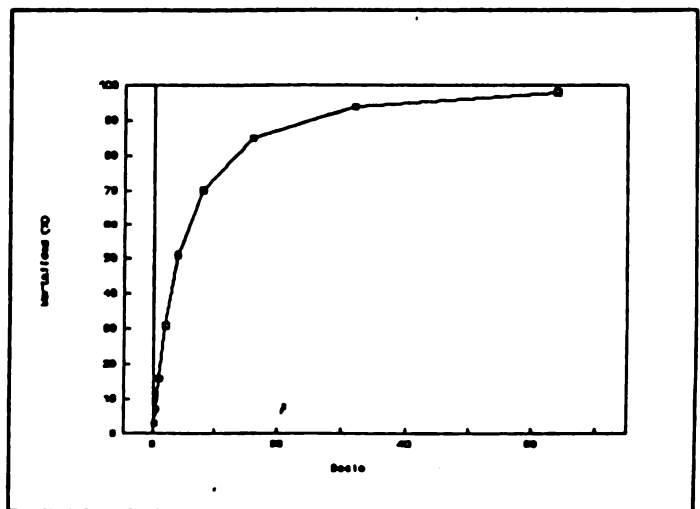


Figure 1 Curva "Dosis - Porcentaje mortalidad" (datos en tabla 2a)

porque se pueden usar métodos estadísticos de regresión lineal.

### Transformación logarítmica

En una figura dosis-mortalidad las distancias entre las diferentes dosis no son iguales. La razón es que hemos usado una serie de dosis exponencial. Si tomamos el logaritmo de la dosis resulta una escala con distancias iguales. Usando esta transformación se puede cambiar la forma asimétrica de la curva de mortalidad. La Figura 2 presenta la curva "Log(Dosis) - Porcentaje mortalidad" (ver datos en tabla 2a y 2b).

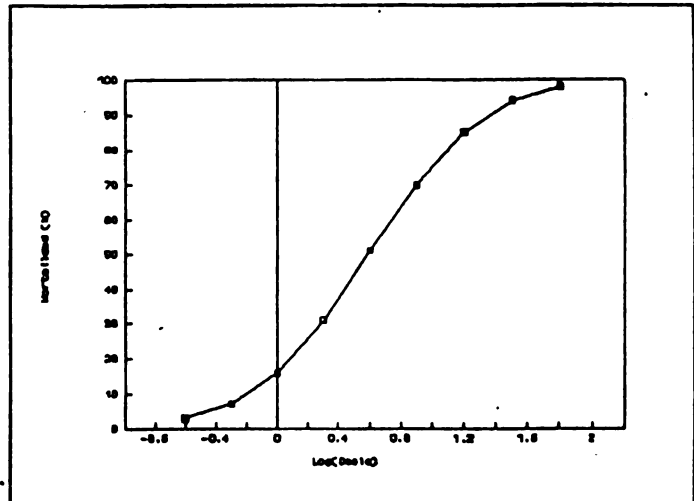


Figure 2 Curva "Log(Dosis) - Porcentaje mortalidad" (datos en tabla 2a y 2b)

*Note que con esta transformación no se puede incluir el testigo en la gráfica.*

### Transformación probit

La curva "Log(dosis) - Mortalidad" tiene una forma sigmoide simétrica. La forma parece muy similar a una acumulativa de la distribución normal donde la escala del eje X se divide en unidades de desviación estándar normal (ver Figura 3). Porque esta escala tiene valores negativos se usa otra escala similar donde se aumenta cada valor con 5. Estas unidades se llaman probits. La transformación porcentaje  $\rightarrow$  probit se presenta en la figura 4.

Tablas de transformación de porcentajes a probits se puede encontrar en muchos libros de estadística. (ver Anexo 1)

Entonces en el bioensayo, los porcentajes con una distribución normal alrededor de 50% se puede transformar en probits. En una gráfica los puntos de "Log(dosis) - Probit mortalidad" forman una línea recta (ver Figura 5). Este línea recta se puede dibujar visualmente o también se puede usar la técnica de regresión lineal para estimar la línea.

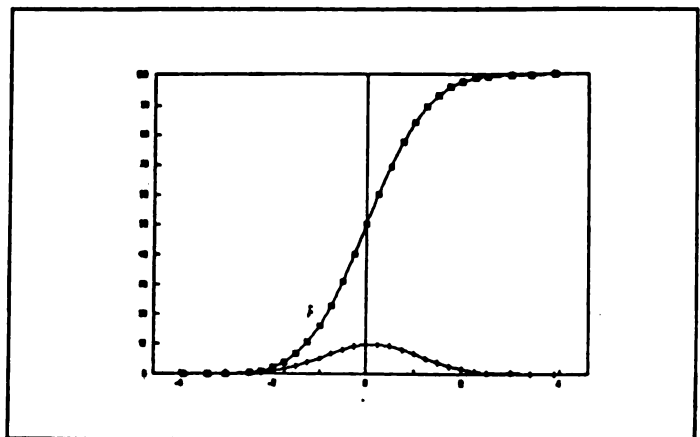


Figure 3 Distribución normal y cumulativa normal

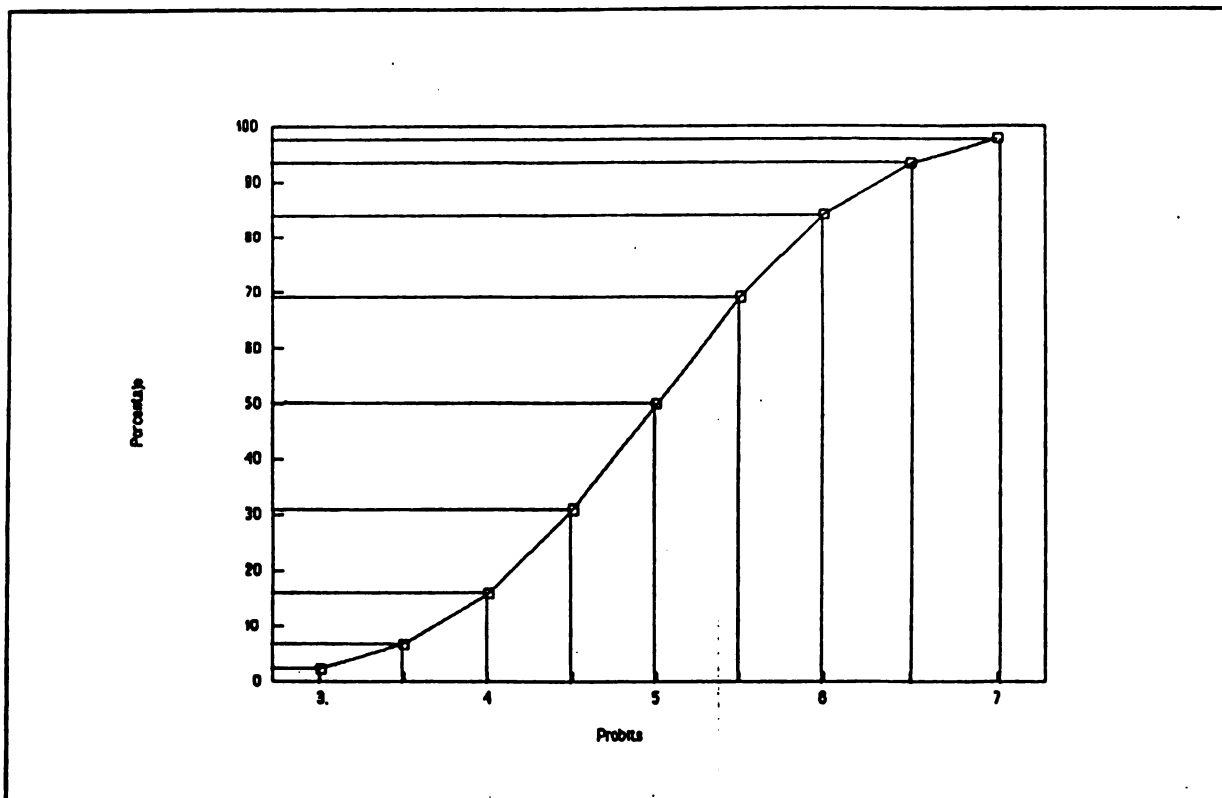


Figure 4 Transformación Porcentajes <--> Probits

### Resumen del método

- Dividir una población de organismos al azar en grupos
- Cada grupo se trata con una diferente dosis incluso un testigo
- Para las dosis se usa una serie exponencial
- De cada grupo se determina el porcentaje respuesta
- Calcular respuesta corregida (formula de Abbott)
- Presentar los datos en una gráfica de Log(Dosis) - Probit mortalidad
- Con el método de regresión lineal construir la recta
- Estimar la DL50 y DL90 de la gráfica

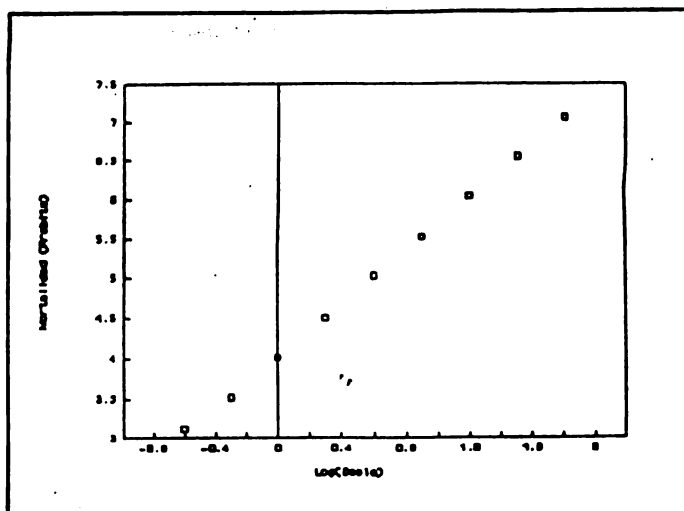


Figure 5 Relación Log(Dosis) - Probits mortalidad (datos en tabla 2b)

## Comparar

El método de probit análisis nos permita comparar el efecto de diferentes productos (por ejemplo comparar Neem con Decis) o comparar diferentes plagas.

### Ejemplo:

Suponga que en un especie de insecto tenemos una raza resistente (R) y una raza susceptible (S). Las curvas Log(Dosis) - Probit mortalidad de los dos tribus se presenta en Figura 6. Para comparar las dos tribus se puede usar la distancia de los rectas paralelas. La susceptibilidad relativa  $r$  indica que S es  $r$  veces mas susceptible que R. La distancia de los rectas es  $\log r$ . (Ver Figura 6)

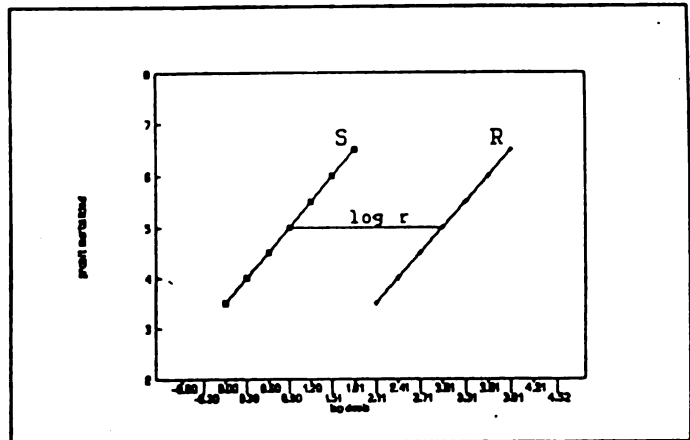


Figure 6 Log dosis - probit mortalidad de dos razas. La raza R es resistente, la raza S es susceptible. La distancia de los rectas paralelas indica la susceptibilidad relativa. S es  $r$  veces mas susceptible que R

## Teoría y práctica

Como siempre la teoría es mas hermosa que la práctica. Por ejemplo en esta teoría no existe una mortalidad de 100%. No obstante en experimentos siempre se va a encontrar una mortalidad de 100% con dosis suficientemente grandes. Para evitar problemas con la forma de la recta es recomendable solo considerar respuestas entre 15% y 85% o sea entre 4 y 6 probits.

Otro problema que se puede encontrar es la homogeneidad de la población. Suponga que se usa una mezcla de los dos razas (ver ejemplo anterior) con proporciones 50% R y 50% S.

Usando esta mezcla en un bioensayo resulta la curva de Figura 7 que no es una recta. Si los diferencias son mas pequeños es mas difícil reconocer la desviación de la recta (por ejemplo en el caso de diferencias entre  $\sigma\sigma$  y  $\text{♀♀}$  o en una mezcla de larvas en diferentes estadios de desarrollo).

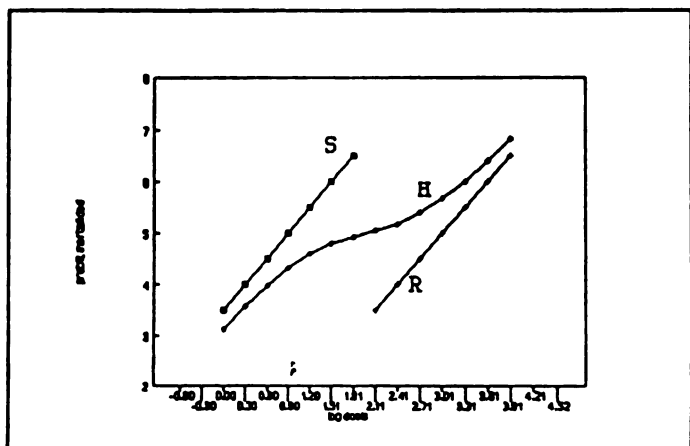


Figure 7 La curva log dosis - probit mortalidad de una raza R (resistente) una raza S (susceptible) y una población heterogeneo H (50% R y 50% S)



## **Interpretar la pendiente de la curva**

La pendiente de la curva indica la variabilidad en el experimento. Una pendiente plano indica mas variabilidad y una pendiente abrupta indica menos variabilidad. La variabilidad se encuentra por parte en la poblacion que se usa en el experimento. No obstante tambien en la ejecucion del experimento se puede introducir variabilidad.

Para comparar dos o más rectas (por ejemplo de 2 diferentes fungicidas) es importante que las líneas están paralelos. En el caso que dos líneas nos están paralelas hay que considerar si es valido comparar los dos plaguicidas.

## **Diferentes métodos**

Ya hemos hablado sobre el análisis probit donde se calcula el  $\log(\text{dosis})$  y se usa una tabla para transformar porcentajes en probits. Después se usa regresión lineal para construir la línea recta y estimar el DL50. Este se puede hacer fácilmente con el programa LOTUS.

En otro método se usa papel gráfico especial con una distribución logarítmico en una eje, y una distribución normal (porcentajes) en la otra eje. En este papel se puede entrar directamente el porcentaje mortalidad con su dosis y dibujar visualmente la línea recta.

Un método más sofisticado es el uso de programas estadísticas (por ejemplo SPSS/PC+) para hacer el análisis. Ventaja de este método es que funciona muy rápido y que el análisis es más preciso.

En los ejemplos prácticos vamos a comparar los diferentes métodos

### Ejemplo 1 : Toxicidad (DL50 y DL90) de un insecticida para un insecto

1) Entrar datos:

Se entra los datos del experimento en LOTUS en 3 columnas. La primera línea tiene los nombres de los 3 variables. Elegir nombres cortos y lógicos. Grabar la hoja de datos en el disco duro con un nombre lógico (por ejemplo C:\DATA\LOTUS\EJEMPL\_1.WK1)

Dose	NumUsed	NumDead
0.16	120	3
0.22	120	11
0.31	119	53
0.43	120	91
0.60	119	107

Dose = Dosis del insecticida

NumUsed = Numero de insectos en el experimento

NumDead = Numero de insectos muertos 24 horas después del tratamiento con insecticida

2) Primer método:

- Usando LOTUS se puede añadir una columna con LOG(dosis) y otra columna con el porcentaje mortalidad.
- Usando una tabla (transformación de porcentaje a probits) se puede añadir una columna con probit mortalidad.
- Hacer una gráfica del tipo XY con LOG(dosis) en el eje X y con Probit Mortalidad en el eje Y. Los puntos se representa por símbolos (no conectarlos con líneas).
- Grabar la gráfica e imprimirla.
- Dibujar visualmente la línea recta y estimar el DL50 y DL90.
- Además, con LOTUS se puede hacer una regresión para calcular la línea recta. ¿ Que es la formula de la línea recta según LOTUS ?

3) Segundo método:

- Usar papel gráfico con distribución en el eje X logarítmico y en el eje Y la distribución normal de probabilidad.
- Entrar las puntos Dosis - Porcentaje Mortalidad
- Dibujar visualmente la línea recta y estimar el DL50 y DL90.

4) Tercer método:

- Entrar el programa SPSS/PC+ y dar los comandos:  
TRANSLATE FROM 'c:\data\lotus\ejempl\_1.wk1' /FIELDNAMES.  
PROBIT NUMDEAD OF NUMUSED WITH DOSE /PRINT ALL.
- ¿ Que es el DL50 y el DL90 ?
- ¿ Que es la formula de la línea recta según el programa SPSS ?

5) Comparar:

- Comparar sus estimaciones del DL50 y DL90 con el análisis del programa SPSS.
- Comparar la línea recta calculado por LOTUS con la línea recta calculado por SPSS. La diferencia se explica porque LOTUS da el mismo peso a cada uno de los 5 puntos mientras SPSS usa diferente peso para los puntos. Este peso esta basado en el número de observaciones y en el porcentaje mortalidad (porcentajes alrededor de 50% tienen más peso que porcentajes muy bajos o muy altos).

## ANALYSE DE LA DOSE LETALE 50

### Présentation du module d'analyse et du gestionnaire de base de données

Michel GINER

CIRAD-CA, UR. Biométrie Informatique  
BP.5035, 2477, Avenue du Val de Montferriand  
34.032 MONTPELLIER Cédex 1 - FRANCE -

#### A) LE LOGICIEL D'ANALYSE DL50 Version 4.6

##### 1) LES OBJECTIFS DU LOGICIEL

Ce logiciel permet d'analyser statistiquement, sur micro-ordinateur et de façon conversationnelle, l'effet de concentrations croissantes d'une matière active insecticide sur le taux de mortalité de lots d'insectes (relation dose x effet), par ajustement des résultats à une droite, après transformation logarithmique des concentrations, et probit des fréquences cumulées de mortalité (droite de Henry) ce qui permet de résoudre le problème de la régression entre des pourcentages et des doses. Il permet de déterminer des doses-seuils ou doses-létales remarquables (DL20, DL50, DL90) entraînant certains taux de mortalité dans la population (respectivement 20%, 50%, 90%) et de tracer le graphique de cette régression linéaire. Il permet également d'archiver les données et les résultats de chaque essai, et d'effectuer le test de parallélisme des droites de régression prises deux à deux.

##### 2) MÉTHODE

La méthode suivie s'inspire du modèle d'analyse proposé par J. GRY (Expérimentation insecticide: détermination des doses létales - INA-PG), lui-même dérivant de celui de FINNEY (probit analysis). Sa programmation s'appuie sur l'algorithme mis au point par DAVIES complété, amélioré et testé par Mr LOTODE (IRCC). Elle comporte les étapes suivantes :

1) Saisie et archivage dans un fichier ou lecture des données : nombre de doses, nombre d'insectes testés et morts dans l'échantillon témoin non traité, doses de toxique, nombre d'insectes testés et morts pour chaque dose.

2) Transformation logarithmique des doses (log10)

3) Calcul de la proportion de mortalité corrigée pour chaque dose, en fonction de la proportion de mortalité naturelle dans le témoin, selon la formule d' ABBOTT :

$$P = \frac{P' - C}{1 - C}$$

avec P = proportion de mortalité corrigée  
P' = proportion de mortalité observée  
C = proportion de mortalité dans le témoin

4) Conversion de la mortalité corrigée en probit empirique Y utilisant l'algorithme d'approximation polynomiale de la distribution normale inverse de HASTINGS, avec affectation des valeurs extrêmes suivantes :

8,4 pour 100% de mortalité et 1,6 pour 0%

5) Calcul de la régression provisoire probit empirique/log10 dose (droite de HENRY) après élimination des doses ayant donné 0 ou 100% de réponse. Si le nombre de doses restantes est inférieur à 5, le programme s'arrête.

6) Calcul itératif, par la méthode du maximum de vraisemblance (avec 10 itérations maximum), des probits attendus, des poids, des probits de travail, puis de la régression pondérée jusqu'à stabilisation de l'estimation du coefficient de régression B (écart relatif inférieur à 0,005 entre 2 itérations).

A partir de la régression provisoire on estime les probits attendus  $Y_1$ , et les ordonnées  $Z$  de la courbe normale de probabilité par la formule :

$$Z = \frac{P^* \ln w}{\sqrt{2\pi}}$$

La mortalité  $P_1$  correspondant à un probit attendu  $Y_1$  (c'est-à-dire l'aire en dessous de la courbe normale de moins l'aire à l'inférieur à  $(Y_1 - S)$ ) est calculée à l'aide d'un autre algorithme d'approximation polynomiale de HASTINGS. Connaissant  $Z$  et  $P_1$  on peut alors calculer les coefficients de pondération avec la formule de FINNEY :

$$W_i = \frac{Z_i}{O(P_1 + \frac{C}{1-C})}$$

où  $O = 1/P_1$

$C =$  proportion de mortalité dans le témoin

Les poids  $W_i$  sont obtenus en multipliant ces coefficients de pondération par le nombre d'effectifs testés pour chaque dose, et les probits de travail  $Y_2$  par la relation :

$$Y_2 = Y_1 + (P - P_1) / Z$$

La régression pondérée peut alors être calculée. Le terme constant (A), la pente (B) et son écart-type sont obtenus.

7) Test de validité de l'ajustement linéaire (test de  $CH_2$ ) et application éventuelle d'un facteur d'hétérogénéité ( $CH_2/CH_1$ ) en cas de  $CH_2$  significatif à  $P=0,05$ , pour calculer les doses létales 20, 50 et 90% et leur intervalle de confiance à  $P=0,05$  :

$$l = z \left( \frac{CH_2}{CH_1} \right) \cdot t(P, 0,05, ddf) \cdot \text{écart-type}$$

avec  $df =$  nombre de doses - 2

si non, en cas de  $CH_2$  non significatif :  $l = z \cdot 1,96 \cdot \text{écart-type}$

8) Archivage des résultats en fin de fichier

9) Représentation graphique des points expérimentaux et de la droite de régression pondérée en coordonnées log.doses et probits de mortalité.

10) Comparaison de deux essais déjà analysés : test de parallélisme de deux droites de régression (test  $t$  sur l'écart entre les coefficients  $B_1$  et  $B_2$ )

11) Calcul de % de mortalité et de doses létales à partir des équations des droites de régression pondérées.

### 3) CARACTÉRISTIQUES ET LIMITES

Cette version 4.6. a été écrite en TURBO-PASCAL 6.0.

Le programme peut traiter entre 5 et 50 doses par essai.

Le nombre d'effectifs testés n'est pas limité et peut varier d'une dose à l'autre.

Les doses entraînant 0% ou 100% de mortalité sont éliminées uniquement pour l'établissement de la régression provisoire, elles participent cependant à l'élaboration de la régression pondérée.

La droite de régression peut être calculée nécessaire au moins 5 doses différentes de 0% et de 100% pour pouvoir être calculée par la logit. Cette limitation a été imposée dans un souci de sécurité, afin que des utilisateurs non spécialistes ne puissent pas obtenir de résultats erronés. En effet, un calcul sur un nombre de points inférieur à cinq compromettrait la validité statistique de la droite de régression.

Le module de saisie utilise une série de tables permettant d'homogénéiser l'orthographe des saisies. La fiche d'analyse peut contenir la représentation graphique de l'essai.

Un module de comparaison de deux essais et un module de calcul de doses ou de mortalité complètent celui d'analyse. La partie graphique offre de nouvelles possibilités : sur un même graphique à est possible de tracer simultanément jusqu'à 6 droites de régression au maximum (6 essais différents), et elle gère elle-même la recopie d'écran pour impression.

Cette version 4.6 fonctionne sous MS-DOS version 3.0 et surannes, reconnaît les cartes graphiques Hercules, CGA, EGA, VGA, ATT (Olivetti) IBM-PC 3270. Elle nécessite une imprimante matricielle 9 aiguilles IBM Graphics, 9 ou 24 aiguilles EPSON, HP Deskjet (compatible HP Laserjet) ou capable de les émuler et ce en 8 résolutions graphiques (attention : toutes les combinaisons ne sont pas utilisables avec toutes les imprimantes). De plus, il est possible de diriger le résultat d'une impression sur un fichier pour soit récupérer le fichier facile dans un rapport soit effectuer un frappe sur une autre imprimante.

Cette nouvelle version est prévue pour être appelée depuis un module de gestion d'une base de données d'essais DL50 développé sous OPEN ACCESS version 3.0

## 4) LES FONCTIONS DU PROGRAMME

### 1) Saisie - Analyse d'un essai

Cette option est la première étape dans la constitution d'un dossier. Elle permet de saisir, modifier ou rappeler les données d'un essai, d'effectuer l'analyse, d'écrire les résultats, d'archiver dans un fichier les données et les résultats principaux de l'analyse. Les différentes opérations qui vont être effectuées sont :

- Saisie des données d'un nouveau fichier et sauvegarde sur disque, ou bien rappel d'un fichier déjà existant, pour modification et/ou nouvelle analyse.

- Transformation des données doses et mortalité respectivement en logarithme décimal et probit.

- Calcul de la droite de régression linéaire associée à cet essai.

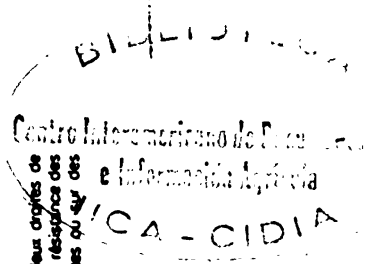
- Calcul des doses létales

- Conclusions et impression des résultats

Afin de faciliter les opérations de saisies et le travail en groupe, il a été adjoint au module de saisie une gestion de tables contenant les valeurs possibles pour le champ pointé. On dispose de tables pour les variables : AUTEUR, MATIERE ACTIVE, UNITE, STADE, DUREE, ESPECE, METHODE DE TRAITEMENT.

### 2) La comparaison de deux essais

Cette deuxième option du menu principal permet de tester le parallélisme de deux droites de régression, afin de pouvoir faire ressortir l'efficacité d'un produit par rapport à un autre ou la résistance des insectes pour deux essais effectués avec un même produit mais à des dates différentes ou sur des populations d'insectes d'origines différentes.



III) Le tracé d'un ou plusieurs essais

Le but de cette fonction est de permettre une représentation graphique aussi fine que possible d'un ou plusieurs essais déjà analysés. Il ne s'agit pas de remplacer le papier millimétré pour ce qui est de la précision mais tout simplement de donner une image de la droite de régression et du nuage de points expérimentaux puisque les possibilités de précision sont dépendantes de la résolution de votre carte graphique. Toutefois, même dans le cas des cartes HERCULES ou VGA, ces résultats graphiques doivent avant tout être considérés comme illustratifs, car en raison de la résolution et des arrondis de calcul, la représentation finale peut être légèrement inexacte.

En appuyant sur les différentes touches de fonctions, vous pouvez :

- Demander une sortie étendue ou non. Par sortie étendue, il faut comprendre une sortie dans laquelle on ne représente que deux plages logarithmiques à la fois mais où l'on fait défiler le graphique sur plusieurs écrans. La sortie normale comprend un écran unique contenant 8 plages logarithmiques. La sortie étendue est à considérer comme une loupe de la sortie normale. Cette option est manipulable par la touche <F5> et ce même en mode graphique.
- Demander ou non la représentation des points expérimentaux sur le graphique. Cette option est manipulable par la touche <F6> et ce même en mode graphique.
- Demander ou non le tracé de la courbe d'essai qui joint les points expérimentaux sur le graphique. Cette option est manipulable par la touche <F7> et ce même en mode graphique.

- Introduire un décalage de la représentation c'est-à-dire modifier l'origine de l'axe des abscisses d'une ou plusieurs plages logarithmiques. Cette option est manipulable par les flèches droites et gauches et ce même en mode graphique.

- Modifier la résolution graphique de la sortie. Par résolution, il faut comprendre l'adresse du point sur le papier. Cette option est manipulable par <Shift-F5> et ce même en mode graphique.

- Modifier la densité horizontale de la sortie. Par densité, il faut comprendre l'étalement du graphique dans le sens horizontal. Cette fonction possède 11 niveaux correspondant à la recopie d'un point tous les 0 à 10 points. Cette option est manipulable par <Shift-F6> et ce même en mode graphique.

- Modifier la densité verticale de la sortie. Par densité, il faut comprendre l'étalement du graphique dans le sens vertical. Cette fonction possède 4 niveaux correspondant à une duplication de lignes dans le graphique :

- Normale : Pas de duplication de lignes
- Double : Chaque ligne du graphique est dupliquée
- Intermédiaire 1 : On duplique une ligne toutes les 2 lignes
- Intermédiaire 2 : On duplique une ligne toutes les 4 lignes

Cette option est manipulable par <Shift-F7> et ce même en mode graphique.

- Modifier le mode de sortie pour obtenir un graphique vertical ou horizontal. Cette option est manipulable par <Shift-F8> et ce même en mode graphique.

La recopie d'écran peut se faire sur n'importe quel type de carte graphique pourvu que l'imprimante matricielle connectée reconnaisse comme langage de programmation la norme IBM, la norme EPSON ou la norme HP. Cette fonction programmée se commande par la touche de fonction <F3> quand le graphique est affiché à l'écran. La recopie d'écran par <Shift-PrintScr> est toujours possible.

IV) Le calcul de doses itales et de taux de mortalité

A partir des équations pondérées de chaque essai, il est possible avec cette option de calculer la dose létale correspondant à un pourcentage précis de mortalité, ainsi que le taux de mortalité correspondant à une quantité déterminée d'insecticide. Ce calcul utilise les deux algorithmes d'approximation polynomiale de la loi normale inverse de Hastings permettant la conversion de valeurs probits en aire et inversement.

B) LE LOGICIEL DL50BD Version 1.0

Initialement l'application DL50 ne gérait que des fichiers essais séparés. Le principal progrès de la version 4.5 était d'offrir la possibilité de conserver dans des "tableaux" les différents noms ou paramètres (tels que : auteurs, matières actives, espèces ...) déjà utilisés, comme le faisait un gestionnaire de base de données. De là à imaginer une véritable version base de données du logiciel, il n'y avait qu'un pas que nous venons de franchir avec cette version 1.0 de DL50BD associée à la version 4.6 de DL50, et dévolupée à l'aide du gestionnaire de base de données d'OPEN ACCESS.

1) Pourquoi une base de données ?

Tout simplement parce que cet applicatif n'aurait aucune possibilité de sélection des essais selon des critères multiples tels que produit, méthode ou insectes testés.

Les contraintes d'élaboration du produit ont été les suivantes :

- permettre de stocker tous les essais DL50 déjà effectués afin de pouvoir rechercher une sélection d'essais (utilisation du langage SQL et/ou sélection manuelle)
- pouvoir continuer à utiliser l'application DL50 indépendamment de la base de données
- assurer une compatibilité avec les autres versions du DL50

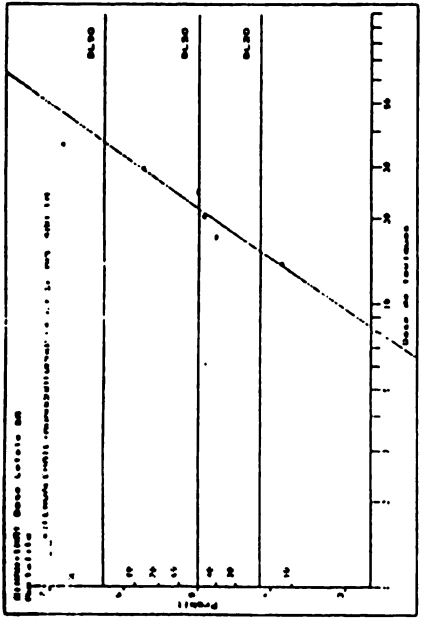
2) Le principe de fonctionnement

Il est assez simple. Au démarrage, le programme exécute une requête qui sélectionne la totalité des essais saisis. Vous pouvez alors demander à rédiger une requête SQL simple afin de définir sur quel ensemble cohérent d'essais vous travaillez puis choisir dans un menu équivalent à celui du programme DL50 VA.6 la fonction désirée. Une fois le module choisi, vous devez sélectionner manuellement les fichiers sur lesquels il va travailler. La sélection achevée, le gestionnaire lance le programme DL50 avec les paramètres adéquats. La génération des fichiers de données DL50 et la prise en charge des éventuelles modifications faites sous le module d'analyse sont entièrement automatisées et transparentes pour l'utilisateur. En effet, tout le monde n'a pas besoin de la partie base de données et pour des raisons de souplesse d'utilisation, il est toujours possible d'utiliser le programme DL50 comme auparavant. Tous les paramétrages de l'application se font dans le module DL50. Bien entendu, il convient, comme pour toute application OPEN ACCESS, de déclarer dans le "Recherche volume", deux volumes : l'un spécifiant le répertoire contenant l'application, et l'autre spécifiant celui qui doit contenir les fichiers (ce doit être le même que celui déclaré dans le paramétrage du programme d'analyse).

3) Les fonctionnalités

Le menu de la version base de données DL50BD offre les options :

- ANALYSE pour analyser / saisir un essai
- COMP\_2 ESSAIS pour comparer les droites de régression de deux essais.
- GRAPHIQUES pour représenter graphiquement de 1 à 6 droites de régression.
- DOSE\_MORTALITE pour calculer une dose ou une mortalité à partir de la fonction de régression d'un essai.
- MODIFIER\_REQUETE pour modifier la requête active
- EXPORTER\_VERS\_DL50 pour exporter un essai contenu dans la base de données sous forme d'un fichier texte compatible avec les anciennes versions du DL50.
- IMPORTER\_DU\_DL50 pour importer dans la base de données un fichier d'essais créé par une des versions du programme DL50.
- MAJ\_TABLES pour assurer la cohérence des dictionnaires de la base de données et du programme DL50.



Nom du fichier : DL743.TXT

Titre de l'essai : FENVALERATE+MONOCROTOPHOS(4:6) SL MPL 48H TM

Date de l'essai :

Auteur :

Espèce: *Spodoptera littoralis (Mpi)*

Stade:

Temp: °C

Matières actives N°1 : Baculovirus Graminose Crypto

N°2 :

Ratio :

Méthode de traitement :

Nombre de doses : 6 exprimées en :

Nombre d'insectes testés dans l'échantillon témoin : 10

Nombre d'insectes morts dans l'échantillon témoin : 0

Pourcentage de mortalité naturelle dans l'échantillon témoin : 0.00000%

N°	Doses	Pop. test	Morts	Log10. dose	Mort. Corrigée	Probit empir.
1	36.31600	30	29	1.56010	0.96667	6.83432
2	30.14000	30	23	1.47914	0.76667	5.72765
3	25.05000	30	15	1.39881	0.50000	5.00000
4	20.70000	30	14	1.31597	0.46667	4.91655
5	17.43000	30	12	1.24130	0.40000	4.74707
6	14.00000	32	4	1.14613	0.12500	3.84956

Régression provisoire :  $Yx = -3.33298 + ( 6.27322 \cdot x)$

Nombre de réponses éliminées (0% ou 100% de mortalité) : 0

Numero de dose	Probit attendu	Poids	Probit de travail
1	6.26458	10.43843	6.26488
2	5.81026	14.98498	5.81026
3	5.35911	18.22136	5.35911
4	4.89392	19.02064	4.89392
5	4.47458	17.26318	4.47458
6	3.94013	13.38979	3.94013

Régression pondérée :

Convergence dans l'estimation du coefficient B de la régression pondérée atteinte après 2 itérations (Ecart relatif sur B < 0.005)

Paramètres statistiques :

Sommes :  
 Poids SWX2 SWX1 SWY SWY2 SWX1 SWX2  
 93.31836 125.74381 170.97221 473.40696 2456.21293 646.56123

Paramètres de la régression :

X moyen Y moyen SX2 SY2 SX1 SY1 Pente Ecart type(B)  
 1.34747 5.07303 1.53404 8.63896 54.60471 5.63721 0.80686

Equation de la droite de régression pondérée :

$$Y = -2.52295 + ( 5.63721 \cdot x)$$

Test de non linéarité de l'ajustement :

Chi2 calculé: 5.792° Degrés de liberté: 4° Probabilité du Chi2: 21.520%

Test de Chi2 non significatif à 5% : ajustement linéaire légitime

Doses létales et limites de confiance pour une probabilité fixée de 5 % :

	Log10.DL	Ecart-type/log.DL	Doses	Limite inférieure	Limite supérieure
DL90	1.56186	0.03576	36.46386	31.02923	42.85034
DL50	1.33452	0.01846	21.60310	19.87654	23.47963
DL30	1.18322	0.02961	15.31872	13.40277	17.50855

*Donald W. Roberts*

# POLO-PC

a user's guide to Probit Or LOgit analysis

Copyright 1987: LeOra Software  
1119 Shattuck Ave.  
Berkeley California 94707

## CONTENTS

Introduction	1
Section 1 Statistical Features	1
Section 2 Aspects of Bioassay Design	2
2.1 Selection of Test Subjects	2
2.2 Sample Size and Dose Selection	3
2.3 Control Groups	3
2.4 Replication	3
Section 3 Installation of the POLO-PC Diskette	4
3.1 Hard Disk Systems	4
3.2 Systems Without a Hard Disk	4
Section 4 Preparation of Data Files	4
4.1 Exporting Data Files from Word Processors	5
4.2 Data Input Format	5
Section 5 Running POLO-PC	8
5.1 Basics	8
5.2 Getting POLO-PC Started	9
5.3 Individual Preparation Analyses	10
5.4 Likelihood Ratio Test of Equality	12
5.5 Likelihood Ratio Test of Parallelism	12
5.6 Summary Printout	13
5.7 Error Messages	13
Section 6 References	14
Appendices Sample Output	15



first two digits of a random number table to dose level A, the second digits to dose level B, and so on.

These randomization procedures work well, given a relatively unlimited supply of test subjects such as that provided by a continuous laboratory culture. When wild populations are tested, some modifications of randomization procedures may be necessary. For example, natural units such as cones may be numbered, then selected at random for assignment to bioassay with each of a group of insecticides. These randomization techniques are not the only ones which an investigator may follow; however, we have found them useful in our routine bioassays. (Instructions for using random number tables are available in statistical textbooks (Goldstein 1964, Snedecor and Cochran 1967).

## 2.2 Sample Size and Dose Selection

Robertson et al. (1964) described sample size limitations for estimating reliable probit or logit regressions. At least 120 test subjects should be tested. Depending on the LD or LC of interest, dose placement varies. For details, consult the original reference.

## 2.3 Control Groups

A control group should be included in any bioassay. In our insect bioassay example, the control is considered to be a dose level of 0 mg. The rationale for control groups is self-evident. Without them, an investigator can never be certain that lethal effects are wholly attributable to the insecticide being tested. The solvent or an impurity in the solvent may have been toxic to the test subjects.

Excess test subjects should not be used as the control group. The controls must represent a random sample selected from the population by same criteria and procedures used to assign test subjects to any other group. Each test chemical should have its own control. POLO-PC will calculate a theoretical control response ("natural response") for each chemical. The program will also calculate response lines without control. In this instance, the program assumes that control mortality is zero. Unless the investigator has reason to assume that control mortality is fact zero, this option is not recommended.

POLO-PC calculates a theoretical response rate of untreated test subjects - the "natural response". It should be emphasized that natural response and control group mortality are not the same. Natural response is a theoretical rate based on the pattern of responses exhibited at all dose levels. The zero and lowest dosages, however, carry more weight in the calculations. Control group mortality is the response rate actually observed in the control group; random variation may cause it to differ somewhat from the theoretical rate.

## 2.4 Replication

A bioassay should be replicated (that is, repeated several times) in order to randomize effects related to laboratory procedure, such as worker or day effects. Suppose that chemical A is to be tested on a population

You must assign the exported file a DOS file name. A DOS file name consists of 1 to 8 alphabetic or numeric characters, followed optionally a period and 1 to 3 additional characters.

#### 4.1 Exporting Data Files from Word Processors

Most word processors have the capability of converting one of the files into a file that PCLO-PC can read. For a selected sample of word processors we give an outline of how this is done.

##### 4.1.1 Word Perfect 3.0

With the data file on the screen, press the "Extended Features" key, and select the "Prepare-Protect" option. Choose "Save Current document as a DOS text file". When prompted, enter a name for the text you are creating. When the file is saved you are returned to your document. This file is now ready to be input to PCLO-PC.

##### 4.1.2 WordStar, Release 4

There are two methods: (1) Open the file as a nondocument file. Press F10. Save the file. (2) At the opening menu, press R. Type the name of the file. To the "Name of printer" prompt, answer "ASCII".

#### 4.2 Data Input Format

Each data file consists of "header" lines, a "preparation" line, and lines with the dose/response data. For purposes of hypotheses testing, header lines delineate the group of data sets to be compared. Under a given header, any number of data sets can be analyzed and compared.

##### 4.2.1 Header Lines

Each group of data sets starts with at least one header line with an equal sign (=) in the first space. Anything else can be typed on the rest of the line. The computer merely prints everything on the header lines, anything useful in identifying the data sets should be present. Any number of header lines can be used to introduce the data sets:

FIGURE 1

```
-----  
=TA-006-S-1-78. Pyrethrins. Dosage expressed  
=in ppm. F77-ND. at 60-90 mg.  
-----
```

##### 4.2.2 Preparation Line

Each separate group of data is called a preparation and is identified by a "preparation line". This line has an asterisk (\*) in the first space. Only one preparation line may be used for each data set.

FIGURE 5

-----  
 #TA-C06-S-1-75 F54-N0 7 days S1S126  
 \*S1S126  
 1 10 3  
 7 91 78  
 20 89 85  
 0 40 2  
 2 30 55  
 5 90 72  
 10 100 89  
 -----

No firm rationale exists for definition of dose groups. In Figures 4 and 5, data for four replications of an experiment were combined. Another procedure is to list data for each replication separately (Fig. 6). This method tends to minimize chi-squared values and  $\chi^2$  by increasing the number of degrees of freedom used in linear regression calculations. Data are listed without summarizing is therefore possible, thus eliminating any inadvertent errors in addition.

FIGURE 6

-----  
 #TA-C06-S-1-75 F54-N0 7 days S1S126  
 \*S1S126  
 0 10 0  
 1 10 3  
 10 10 9  
 0 10 2  
 2 30 18  
 5 30 24  
 7 30 26  
 10 30 30  
 20 30 28  
 0 10 0  
 20 30 18  
 5 30 22  
 7 30 24  
 10 30 29  
 20 30 28  
 0 10 2  
 2 30 19  
 5 30 26  
 7 30 28  
 10 30 30  
 20 29 29  
 -----

#### 4.2.4 Arithmetic Metameter Option

If doses are not to be converted to logarithms, a 0 line should be entered as the last line in the data file. This line should have a 0 in the first space and a 1 in the third space.

place: CTRL and S. This way, you don't have to move your fingers while watch the screen.

### 5.1.3 Diverting the Screen Display to the Printer

Before starting the program, described in the next section, press C and PrtSc. From now on, everything that normally appears on the screen will be printed instead. Afterwards, press CTRL-PrtSc again to revert to normal working.

## 5.2 Getting POLO-PC Started

For hard disk systems: Get into the directory POLO-PC is in. At the "C>" prompt, type POLO and press RETURN. The program starts to run. A prompt will appear (Input file>), after which you type the name of your data file and press RETURN. In Appendix A, the data file name is chosen.

For systems without a hard disk: With the copy disk in drive A, type A:POLO and press RETURN. The program starts to run. From here on it is the same as the hard disk version.

After you type the name of the input file, POLO-PC reads your data and prepares to process it. The data file appears on the screen (Appendix B) followed by the standard metameter listing. It consists of preparation name, dose, logarithm of dose, number of test subjects, number of responses, and decimal proportion of responses. Below the metameter listing, the numbers of preparations and dose groups are listed.

### 5.2.1 Command Questions

POLO-PC next asks you command questions (Appendix C). (In the original POLO, the same information was specified by command cards.)

### 5.2.2 Do you want probits?

Either the probit (answer Y RETURN or RETURN only) or the logit (N RETURN) may be chosen. Except at extreme response levels (>95%, <5%), results with the two methods differ very little. In the extreme tails of the tolerance distribution, results may vary substantially: without knowing the "true" distribution of your data, your choice of method is arbitrary and without any basis besides personal preference.

### 5.2.3 Is natural response a parameter?

Given the presence of control groups, type Y RETURN or RETURN. If you have no controls (not a recommended practice), type N RETURN.

### 5.2.4 Do you want the likelihood function to be maximized?

Typing Y RETURN or RETURN instructs POLO-PC to maximize the likelihood function automatically. If you type N you must specify starting

D1 and D3, no response was observed in either control group; it follows therefore, that the program will operate by "not estimating natural response." In Appendix D2, on the other hand, the program will be "estimating natural response" because mortality was observed in the control.

In line 3 of the printout, the logarithm of the maximum value of the likelihood function for each preparation is presented (line 3, App. D3). In the next section (lines 4-6, App. D1, D3; lines 4-7, App. D2) values of the intercept (labelled with the preparation title), slope, and natural response (where appropriate) are listed in the column called "parameter". The standard errors and t-ratios (parameter value divided by standard error) of each parameter are listed in the succeeding column. Note that, unless the t-ratio is greater than 1.96, the regression is not significant and results that are printed are meaningless.

The variance-covariance matrix of the parameters is listed next (lines 7-10, App. D1, D3; lines 8-12, App. D2), followed by the chi-square goodness-of-fit test (lines 11-17, App. D1, D3; lines 13-19, App. D2). The chi-squared value, degrees of freedom, and heterogeneity factor (which equals the chi-square divided by the degrees of freedom) follow (lines 18-20, App. D1, D3; line 20, App. D2). When the heterogeneity factor exceeds 1.0, the user is cautioned by a warning (lines 21-24, App. D2; lines 19-22, App. D3). The program suggests that a plot of the data be consulted, since the model fits the data poorly. Although random variation (usually termed "experimental error") may account for a large chi-square (and heterogeneity), a plot of the data may reveal systematic variation from linear regression. In this eventuality, use of a different mathematical function may be more appropriate for analyzing the data. In most cases, variation in insecticide bioassays cannot be classified as systematic; nevertheless, you have been warned of a problem with the data and are free to decide what, if anything, to do about it.

The "index of significance for potency estimation" (lines 19-20, App. D1; lines 25-26, App. D2; lines 23-24, App. D3) is the statistic which is used for calculation of confidence limits at three probability levels - 90, 95, and 99. If, at any of these levels,  $g$  exceeds 1.0, values of the mean may lie outside the limits; for very large values, the confidence limits run from negative infinity to positive infinity (Finney 1971). As a safety feature, POLO-PC calculates confidence limits only when  $g$  is less than 0.5 at either the 90, 95, or 99 percent probability levels. A warning about  $g$  is printed (lines 27-29, App. D2; lines 25-27, App. D3) when  $g$  at any of the three probability levels is greater than 0.5. Should this occur, a statement (line 30, App. D2; line 28, App. D3) of the maximum value of  $g$  which the program will accept is printed. Note that the value of  $g$  is less than 0.5 at all three probability levels in Appendix D1; no warning statement appears, and 90, 95 and 99 percent confidence limits have been calculated (lines 21-28, last 3 columns, App. D1). In sections D2 and D3, however,  $g$  exceeds 0.5 at the 99 percent probability level; the user is given the  $g$  warning and only 90 and 95 percent confidence limits are calculated (last two columns each of lines 31-38, App. D2 and lines 29-36, App. D3).

Calculated effective doses (lethal doses or lethal concentrations depending on the test technique) are the final portion of each section (lines 31-28, App. D1; lines 31-38, App. D2; lines 29-36, App. D3). In the first column, the percent effect of dose level is labelled. The standard option lists LD<sub>10</sub>, LD<sub>50</sub>, and LD<sub>90</sub>. In the next column, the preparation name is reprinted. The column labelled "dose" lists the calculated dose

The logarithm of the likelihood function for the composite line generated when the slopes of the preparations are constrained to be the same is calculated next (line 3, App. F). The intercepts for the individual preparations with slopes constrained (lines 5-7, App. F) and slope of the composite line (line 8, App. F), standard errors of the parameters and t-ratios for each line are printed. The variance-covariance matrix is also listed (lines 9-14, App. F).

The likelihood ratio test for parallelism (lines 15-17, App. F) is presented in the same format described for the test of equality. Degrees of freedom, (d.f.) for the test equals the number of preparations (three) times the number of parameters constrained (one: the slope), minus the number of constrained parameters in the composite line (one: the slope). In this example,  $d.f. = (3-1) \times 1 = 2$ . As in the test for equality, the hypothesis is accepted when the tail probability is greater than 0.05. In the present example, the hypothesis is accepted.

The statistics for the chi-squared goodness-of-fit test of the combined line and the calculation of  $g$  are shown in lines 18-36, App. F. These precede the calculations of effective doses and confidence limits for the individual preparations (lines 37-56, App. F) assuming the same slope as the composite line. Finally, the potency of each preparation relative to the first preparation in the group (lines 57-62, App. F) is calculated according to the procedures of Finney (1971, p. 100-124).

## 5.6 Summary Printout

The summary printout in Appendix G is a guide to the body of the analysis and a synopsis of pertinent information. The header line title is first printed (line 1, App. G). Then, key statistics for each preparation are listed (lines 2-19, App. G). The first line lists the preparation title, number of subjects treated, and number of controls. In the next line, the log of the likelihood function, slope plus or minus standard error, and natural response plus or minus standard error are listed (lines 3, 9, 15, App. G). Heterogeneity and the value of  $g$  at the 95 percent level follow (lines 4, 10, 16, App. G). The next three lines give LD<sub>10</sub>, LD<sub>50</sub>, and LD<sub>90</sub> values with their respective 95 percent confidence limits (lines 5-7, 11-13, 17-19, App. G).

The last two groups summarize the likelihood ratio tests for equality and parallelism (lines 20-26, 27-33, App. G). The statistics for each composite line with the appropriate constraints are printed as they were for individual preparations. If the value of  $g$  exceeds 0.5 at the 95 percent level, no list of LD values will appear in the summary. The user should refer to the analysis for possible reasons.

## 5.7 Error Messages

Error messages and their explanation:

- "The data on this record seems to be out of order"  
The number responding on a dosage-response line is greater than the number of test subjects. The usual reason is transposing of the numbers when either writing the data forms or keying the data.
- "The maximum number of dose groups is 300"

APPENDICES Sample Output

The appendices show the output for a single computer run, broken into sections A, B, C, etc. for annotation. Every line displayed is shown here and many are discussed in the text. The line numbers on the left have been added, and so have the appendix headings. Otherwise, what you see here is exactly what appears on the screen.

APPENDIX A Sign On

C:\polo

POLO-PC  
(C) Copyright LeOra Software 1987

Input file > chor.dat

APPENDIX B Input of Data

input: =CHORISTONEURA SPECIES, RESMETHYLIN  
input: = This is the example used in the paper 'POLO: A new computer  
input: = program for probit analysis' by Russell, Robertson, and Sev  
input: = published in the Bulletin of the Entomological Society of  
input: = America, Sept 1977. The paper contains samples of the  
input: = printout.

input: \*V-72  
input: 0 40 0  
input: 0.03 68 13  
input: 0.05 77 15  
input: 0.07 76 38  
input: 0.10 79 55  
input: 0.20 79 69  
input: \*L-74  
input: 0 359 7  
input: 0.1 70 22  
input: 0.2 49 27  
input: 0.3 50 33  
input: 0.5 50 48  
input: \*C-74  
input: 0 30 0  
input: 0.02 48 12  
input: 0.03 50 13  
input: 0.05 50 11  
input: 0.07 48 11  
input: 0.10 59 52

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subject
V-72	.00000	.000000	40.	0.	.000
	.03000	-1.522879	68.	13.	.191
	.05000	-1.301030	77.	26.	.338
	.07000	-1.154902	76.	38.	.500
	.10000	-1.000000	79.	55.	.696
	.20000	-.698970	79.	69.	.872
L-74	.00000	.000000	359.	7.	.019

19 Index of significance for potency estimation:  
 20  $g(.90) = .03278$   $g(.95) = .04655$   $g(.99) = .08039$

21 Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
22					
23	LD10	V-72	.02159	lower	.01616 .01508 .01276
24				upper	.02657 .02748 .02971
25	LD50	V-72	.06852	lower	.06153 .06020 .05751
26				upper	.07607 .07764 .08091
27	LD90	V-72	.21753	lower	.17895 .17338 .16366
28				upper	.28504 .30409 .35093

APPENDIX D2 Preparation 2

1 Intercepts and slopes unconstrained. Preparation is (2) L-74  
 2 Estimating natural response

3 Maximum log-likelihood -148.89634

	parameter	standard error	t ratio	
4				
5	L-74	2.3061196	.30239885	7.5260858
6	NATURAL	.19659070E-01	.73583958E-02	2.6716516
7	SLOPE	2.9212016	.40334025	7.2425243

8 Variance-Covariance matrix

	L-74	NATURAL	SLOPE	
9				
10	L-74	.9144507E-01	.4465723E-04	.1153571
11	NATURAL	.4465723E-04	.5414599E-04	.1677942E-03
12	SLOPE	.1153571	.1677942E-03	.1525834

13 Chi-squared goodness of fit test

preparation	subjects	responses	expected	deviation	probability	
14						
15	L-74	70.	22.	19.853	2.147	.283616
16		49.	27.	29.988	-2.988	.612001
17		50.	38.	39.310	-1.310	.786205
18		50.	48.	46.234	1.766	.924684
19	NATURAL	359.	7.	7.058	-.058	.019659

20 chi-square 2.1916 degrees of freedom 2 heterogeneity 1.0958

21 A large chi-square indicates a poor fit of the data by the probit  
 22 analysis model. Large deviations for expected probabilities near 0 or  
 23 1 are especially troublesome. A plot of the data should be consulted.  
 24 See D. J. Finney, "Probit Analysis" (1971), pages 70-75.

25 Index of significance for potency estimation:

26  $g(.90) = .17812$   $g(.95) = .38674$   $g(.99) = 2.0578$

27 "With almost all good sets of data, g will be substantially smaller  
 28 than 1.0, and seldom greater than 0.4."

29 - D. J. Finney, "Probit Analysis" (1971), page 79.



29	Effective Doses					
30		dose	limits	0.90	0.95	0
31	LD10 C-74	.01329	lower	.00638	.00392	
32			upper	.01924	.02112	
33	LD50 C-74	.04139	lower	.03279	.02926	
34			upper	.05062	.05482	
35	LD90 C-74	.12892	lower	.09351	.08611	
36			upper	.24008	.36089	

APPENDIX E Lines Are the Same

1 Intercepts and slopes constrained (lines are the same)  
 2 Not estimating natural response

3 Maximum log-likelihood -549.84212

4		parameter	standard error	t ratio
5	INTERCPT	1.8012042	.15715197	11.461544
6	SLOPE	1.5272332	.13708255	11.140975

7 Variance-Covariance matrix

8		INTERCPT	SLOPE
9	INTERCPT	.2469674E-01	.2061925E-01
10	SLOPE	.2061926E-01	.1879163E-01

11 Testing hypothesis that slopes and intercepts are the same  
 12 chi-square 83.2907 degrees of freedom 4 tail probability .00  
 13 Hypothesis REJECTED

14 Chi-squared goodness of fit test

15	preparation	subjects	responses	expected	deviation	probability
16	INTERCPT	68.	13.	20.396	-7.396	.2999
17		77.	26.	32.826	-6.826	.4263
18		76.	38.	39.134	-1.134	.5149
19		79.	55.	48.028	6.972	.6079
20		79.	53.	60.707	8.293	.7684
21		70.	22.	43.096	-21.096	.6156
22		49.	27.	37.877	-10.877	.7729
23		50.	38.	42.255	-4.255	.8450
24		50.	48.	45.594	2.406	.9118
25		48.	12.	10.259	1.741	.2137
26		50.	15.	14.997	.003	.2999
27		50.	31.	21.316	9.684	.4263
28		48.	31.	24.716	6.294	.5149
29		59.	52.	35.869	5.131	.6079

30 chi-square 88.522 degrees of freedom 12 heterogeneity .33

31 A large chi-square indicates a poor fit of the data by the probit  
 32 analysis model. Large deviations for expected probabilities near 0 or  
 33 1 are especially troublesome. A plot of the data should be consulted

26		49.	27.	29.938	-2.938	.61
27		50.	38.	38.577	-1.577	.77
28		50.	48.	45.402	-2.598	.95
29	C-74	48.	12.	9.603	2.392	.27
30		50.	15.	17.715	-2.715	.23
31		50.	31.	29.287	-1.743	.65
32		48.	31.	34.882	-3.882	.27
33		59.	52.	49.837	2.163	.93

34 chi-square 7.1435 degrees of freedom 10 heterogeneity

35 Index of significance for potency estimation

36  $g(.90) = .01428$   $g(.95) = .02028$   $g(.99) = .03512$

37 Effective Doses

		dose	limits	0.20	0.95	
38						
39	LD10	V-72	.02258	lower	.01868	.01792
40				upper	.02539	.02711
41		L-74	.05243	lower	.04163	.03961
42				upper	.06355	.06572
43		C-74	.01365	lower	.01107	.01052
44				upper	.01624	.01674
45	LD50	V-72	.06864	lower	.06199	.06076
46				upper	.07591	.07741
47		L-74	.15939	lower	.13806	.13415
48				upper	.18292	.18778
49		C-74	.04149	lower	.03663	.03573
50				upper	.04585	.04796
51	LD90	V-72	.20869	lower	.17962	.17524
52				upper	.24973	.25875
53		L-74	.48458	lower	.40147	.38967
54				upper	.55534	.56396
55		C-74	.12513	lower	.10767	.10472
56				upper	.13213	.13539

57 Relative potencies

		potency	limits	0.20	0.95	0.99
58						
59	L-74	.43065	lower	.36225	.35157	.32965
60			upper	.51299	.53112	.55932
61	C-74	1.65449	lower	1.41252	1.36987	1.23924
62			upper	1.94141	2.00340	2.13281

APPENDIX G Summary

1 CHORISTONEURA SPECIES, RESMETHRIN  
 2 V-72 subjects 379 controls 40  
 3  $\log(L) = -214.0$  slope =  $2.555 \pm .281$  nat. resp. =  $.000 \pm .000$   
 4 heterogeneity = .26  $\hat{\sigma} = .047$   
 5 LD10 = .022 limits: .015 to .027  
 6 LD50 = .069 limits: .060 to .078  
 7 LD90 = .218 limits: .173 to .304

Screen

# Análisis de probit por el programa POLO

Input file > plprep.dos → en un procesador de palabras. (WPS)

```
input: =Bioensayo de rotenona
input: *Hard Disk:SoftPC:plprep.dos
input: 014910
input: 2.6 50 6
input: 3.8 48 16
input: 5.1 46 24
input: 7.7 49 42
input: 10.2 50 44
```

Datos:  
 = Título  
 \* Preparación (=químico)  
 Dosis    Número    Número  
           total        de

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
Hard Dis	.00000	.000000	49.	0.	.000
	2.60000	.414973	50.	6.	.120
	3.80000	.579784	48.	16.	.333
	5.10000	.707570	46.	24.	.522
	7.70000	.886491	49.	42.	.857
	10.20000	1.008600	50.	44.	.880

Number of preparations: 1  
 Number of dose groups: 5  
 Do you want probits [Y] ? *se contesta*  
 Is Natural Response a parameter [Y] ?  
 Do you want the likelihood function to be maximized [Y] ?  
 LD's to calculate [10 50 90] >  
 Do you want to specify starting values of the parameters [N] ? *si quiere especificar los valores de los parámetros*

*si se desea estimar la rta natural*  
*si se quiere maximizar la función*  
 Especificar el tipo de análisis.

Maximum log-likelihood **-120.05164**  
 parameter    standard error    t ratio  
 Hard Dis **I** -2.8874632    .35013431    -8.2467303  
 SLOPE **II** 4.2131967    .47830318    8.8086321

Valores de parámetros  
 $a = 5 + \text{I}$   
 $b = \text{II}$

Variance-Covariance matrix  
 Hard Dis    SLOPE  
 Hard Dis    **.1225940**    -.1615113  
 SLOPE        -.1615113    **.2287739**

Ecuación:  
 $Y = a + bX$   
 $Y = (5 - 2.89) + 4.21x$   
 $Y = 2.11 + 4.21x$

Chi-squared goodness of fit test

preparation	subjects	responses	expected	deviation	probability
Hard Dis	50.	6.	6.367	-.367	.127331
	48.	16.	15.757	.243	.328261
	46.	24.	24.716	-.716	.537314
	49.	42.	39.280	2.720	.801641
	50.	44.	45.670	-1.670	.913396

$\chi^2$   
 bondad de ajuste

Chi-square **1.7289** degrees of freedom **3** heterogeneity **.58**

Index of significance for potency estimation:  
 $g(.90) = .03487$      $g(.95) = .04951$      $g(.99) = .08551$

# Analysis of Time-Dose-Mortality Data

HAICANOUSH K. PREISLER AND JACQUELINE L. ROBERTSON  
Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA,  
Berkeley, California 94704

J. Econ. Entomol. 82(6): 1534-1542 (1989)

**ABSTRACT** Mortality of last instar western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* Freeman, exposed to a series of increasing doses (topical application) or concentrations (diet incorporation) of 10 insecticides was analyzed over 7 d by time-dose-mortality regression. Regression based on the complementary log-log model was useful for analyzing time trends for all dose levels simultaneously. Each of the 10 insecticides acted more quickly when applied topically. In both kinds of experiments, speed of lethal action of the insecticides depended on dose or concentration. The statistical methods developed to estimate lethal doses as functions of time and median times of death as functions of dose are more efficient than methods published previously.

**KEY WORDS** Insecta, *Choristoneura occidentalis*, complementary log-log regression, median time to death

TIME-DOSE (or concentration) relationships to mortality are of practical and theoretical importance in studies of pesticide activity. For some insect species, e.g., *Conophthorus ponderosae* Hopkins, the primary criteria for selection of a pesticide are speed of kill and residual activity that persists for the period during which females will attack host cones and sever connection tissue (Haverty & Wood 1981). In theoretical studies, time trends in mortality may be useful preliminary indicators of chemical mode of action and detoxification mechanisms.

Data from time-dose-response experiments are usually analyzed by separate models of time trends for each dose (Hewlett 1974, Dell et al. 1983) or of dose trends for each time (Shapiro et al. 1987). Such methods are inefficient because they do not use the entire data set in the estimation procedure. In addition, precise descriptions of pesticide activity over time become more difficult when time trends and dose trends are described separately. Time-dose-response data also have been analyzed by fitting probit curves (with time replacing dose) to mortality data for a fixed dose over time (Su et al. 1987). However, this procedure is not appropriate for time-response data because responses at different time points are correlated.

Here we describe an efficient method for estimation of mortality probabilities, over time, of test populations exposed to a series of increasing doses or concentrations of pesticides. The serial dependence of data observed over time was accounted for by modeling conditional mortality probabilities of insects that were alive when each time interval began.

## Materials and Methods

**Insecticides.** Technical quality samples of 10 insecticides were tested. These were acephate (Chevron Chemical Company, Richmond, Calif.), aminocarb (Molbey Chemical Corporation, Kansas City, Mo.), carbaryl (Union Carbide Agricultural Products, Research Triangle Park, N.C.), DDT (City Chemical Corporation, New York), deltamethrin (Roussel Uclaf, Paris), methomyl (E. I. du Pont de Nemours, Wilmington, Del.), mexacarbate (Dow Chemical Company, Midland, Mich.), permethrin (FMC Corporation, Philadelphia), phosmet (Stauffer Chemical Company, Mountain View, Calif.), and pyrethrins (McLaughlin Gormley King Company, Minneapolis). All chemicals were formulated in reagent grade acetone on the basis of weight (AI) per unit volume. A fresh stock solution of each chemical was prepared for each replication with each bioassay method.

**Insects.** Last instar western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* Freeman, were selected at random from the 75th generation of a non-diapausing laboratory colony reared as described by Robertson (1979). Average weights of each treatment group of 10 larvae ranged from 30 to 50 mg. This narrow weight range was used so that variable weights would not confound results (Robertson et al. 1981). Male and female larvae were tested separately (but simultaneously) in each experiment. (The paired testes of male larvae are clearly visible beneath the dorsal cuticle.)

**Bioassays.** Methods for topical application and diet incorporation bioassays described by Savin et al. (1977) and Robertson (1980), respectively, were

used. In both types of experiments, insects were held in sterile plastic Petri dishes lined with filter paper. Insects treated topically were provided with fresh artificial diet after treatment.

The number of doses per chemical in topical application bioassays ranged from 6 to 11; in diet incorporation bioassays, 6 to 10 concentrations were tested. Controls, either topically treated with acetone or fed diet to which acetone had been added, were included with each treatment replication. In each type of bioassay with each chemical, at least three replications with 20 males and 20 females were done with five of the doses or concentrations. Extra doses (or concentrations) included in bioassays resulted from our initial failure to bracket 5-100% mortality during the observation periods after treatment.

Mortality in each treatment group was recorded at 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h in topical application experiments with aminocarb, permethrin, pyrethrins, deltamethrin, mexacarbate, and methomyl. For all other insecticides tested topically and for all those tested in the diet, mortality also was recorded at 96, 120, 144, and 168 h. Each time mortality was recorded, each dead insect was removed from the treatment dish, held in a separate container, and its condition was verified at the time of the next observation. This ensured that an insect was counted as dead at only one observation interval and that each insect scored as dead was, in fact, dead.

## Statistical Methods

**Time-Dose-Mortality Regressions.** For a fixed exposure time  $t_j$  ( $j = 1, \dots, J$ ) to a toxicant at a concentration  $d_i$  ( $i = 1, \dots, I$ ) the basic model for the mortality probability ( $p_{ij}$ ) of an insect by time  $t_j$  is

$$p_{ij} = 1 - \exp[-\exp(r_i + \beta \log_a(d_i))] \quad (1)$$

where  $\beta$  is an unknown parameter and  $r_i$  are unknown categorical variables corresponding with the times  $t_j$ . The linear part of (1), i.e.,  $r_i + \beta \log_a(d_i)$ , is called the complementary log-log (CLL) line or the linear predictor of the CLL model. The model assumes that  $\log(-\log(1 - p_{ij}))$  is linear in the covariates. The Weibull function that is sometimes used in modeling responses over time for fixed doses (e.g., Dell et al. 1983) is a special case of model (1); it is obtained by replacing  $\beta \log_a(d_i)$  by a constant and replacing  $r_i$  by  $\tau \log(t_j)$  for some constant  $\tau$ .

Alternative models with probit or logit linear predictors on time and dose also can be used to model the mortalities for different concentrations over time. Use of the CLL model has two advantages. First, a mechanistic and probabilistic interpretation of the CLL model can be based on relations between toxicant molecules and hypothetical key receptors of the organism (Christensen & Chen 1985). According to this interpretation, the slope

( $\beta$ ) represents the average number of toxicant molecules per receptor. Second, if the mortality probabilities ( $p_{ij}$ ) are assumed to follow the CLL model, the conditional mortality probabilities ( $q_{ij}$ ) of an insect dying in the time interval  $(t_{j-1}, t_j]$  out of those still alive at the start of the interval is also expressed by a CLL model, i.e.,

$$q_{ij} = P(\text{insect dies in interval } (t_{j-1}, t_j] \text{ given it was alive at time } t_{j-1}) \\ = 1 - \exp[-\exp(r_i + \beta \log_a(d_i))] \quad (2)$$

where  $r_i$  are unknown parameters corresponding with the time intervals  $(t_{j-1}, t_j]$  and  $\beta$  is the same parameter as in (1). The relationship between  $r_i$  and  $r_j$  is given by

$$r_i = \log(e^{r_j} + e^{r_j} + \dots + e^{r_j}) \quad (3)$$

(Bartlett 1978). The mortality probabilities ( $q_{ij}$ ) are useful in the estimation procedure because they permit use of the multiplicative rule of conditional probabilities to derive an overall likelihood function (i.e., for all dose levels and time points simultaneously) that is basically a product of binomials for the complete data set (Preisler 1989). Standard computing packages such as GLIM (Payne 1986) and GENSTAT (Alvey et al. 1982) can then be used to obtain efficient estimates of the parameters  $r_i$  and  $\beta$  in the CLL line

$$r_i + \beta \log_a(d_i) \quad (4)$$

and, by means of Equation 3, estimates for  $r_j$ . **Maximum Likelihood Estimates of Parameters.** Given the data triplets ( $d_i, n_i, r_i$ ), where

$n_i$  = number of insects alive at time  $t_{j-1}$  out of  $n$ , insects exposed to dose  $d_i$  at time  $t_j$ ,  
 $r_i$  = number of insects that died in the time interval  $(t_{j-1}, t_j]$

maximum likelihood estimates (MLEs) of the parameters  $r_i$  and  $\beta$  are obtained by maximizing the likelihood function

$$\prod_{i=1}^I \prod_{j=1}^J q_{ij}^{r_i} (1 - q_{ij})^{n_i - r_i} \quad (5)$$

A FORTRAN maximizing routine can be used to calculate the MLEs. For our data sets, MLEs were calculated by GLIM with the binomial error distribution and the CLL transformation option. Controls (dose or concentration = 0) were included in the model by displacing all dose levels by small positive amounts (Tukey et al. 1985). The parameters  $r_i$  were estimated by replacing the  $r_i$  values in Equation 3 with their corresponding estimates. Variances of  $r_i$ 's and  $\beta$  were estimated with the formulas for asymptotic approximation of variances of functions of parameters (Lehmann 1966, 274):

$$\text{var}(\hat{r}_i) = \frac{1}{e^{r_i}} \sum_{j=1}^J e^{r_j} \text{cov}(\hat{r}_j, \hat{r}_i) \quad (6)$$

and

$$\text{cov}(\hat{\tau}_i, \hat{\beta}) = \frac{1}{\sigma^2} \sum_{j=1}^k e^{\tau_j} \text{cov}(\hat{\beta}, \hat{\tau}_j) \quad (7)$$

where estimates for  $\text{cov}(\hat{\tau}_i, \hat{\tau}_j)$  and  $\text{cov}(\hat{\beta}, \hat{\tau}_j)$  were obtained from the GLIM run

Estimation of Lethal Doses over Time. Let  $LD_i(t_i)$  denote the dose (or concentration) that will cause  $x\%$  mortality by time  $t_i$ . Estimates of the logarithms of lethal doses,  $\theta_i = \log_{10}(LD_i(t_i))$ , were calculated by the formula

$$\theta_i = \frac{a_i - \tau_i}{\beta} \quad (8)$$

where  $a_i = \log(-\log(1 - x))$ . Using the asymptotic approximation of variances of functions of parameters, the formula for the variance of  $\theta$  is given by

$$\frac{1}{\beta^2} [\hat{\sigma}_{\theta}^2 \text{var}(\hat{\beta}) + \text{var}(\hat{\tau}_i) + 2\hat{\beta} \text{cov}(\hat{\tau}_i, \hat{\beta})] \quad (9)$$

Plots of  $LD_i(t_i)$  against  $t_i$  permit comparison of effectiveness at selected times after insects are exposed to different chemicals.

Estimates of Speed of Lethal Action. For a fixed amount of a toxicant, SLT denotes the lethal time of susceptible insects, i.e., if end-point mortality denotes the proportion of insects that have died by the end of the experiment,  $SLT_{50}$  is the amount of time required to reach 90% of the end-point mortality. Thus, for example, if 75% of the insects treated with dose  $d_i$  are expected to die by the end of the experiment, then  $SLT_{50}$  is the amount of time required to achieve 0.9 x 75% = 68% mortality. The median lethal time,  $SLT_{50}$ , is an estimate of the expected time between exposure to a dose and death of a susceptible insect, and so is a measure of the speed of lethal action of the insecticide.

Formulas for estimating SLT depend on the functional form of the estimator for  $\tau_i$ . For example, if  $\tau_i = \tau \log(t_i)$ , then estimates of  $\log_{10}(SLT_{50})$  for a given dose ( $d_i$ ) are evaluated by

$$\log_{10}(SLT_{50}) = \frac{a(d_i) - \hat{\beta} \log_{10}(d_i)}{\tau} \quad (10)$$

where  $a(d_i) = \log(-\log(1 - 0.5\hat{p}_{ij}))$  and  $\hat{p}_{ij}$  is an estimate of the end-point mortality probability calculated by evaluating Equation 1 at time  $t_j$  (i.e., at the end of the experiment) if the  $\tau_j$ 's are fitted by categorical time variables. Estimates of  $SLT_{50}$  can be obtained by the linear interpolation

$$SLT_{50} = t_i + (t_{i+1} - t_i) \frac{z - \hat{\tau}_i}{\hat{\tau}_{i+1} - \hat{\tau}_i} \quad (11)$$

where  $z = a(d_i) - \hat{\beta} \log_{10}(d_i)$  and  $\hat{\tau}_i < z < \hat{\tau}_{i+1}$ . Plots of  $SLT_{50}$  against various doses permit the study of the effects of dose on the speed of death.

An alternative estimate sometimes used to study effects of dose on speed of death is the time re-

quired to achieve 50% ( $LT_{50}$ ) or 90% ( $LT_{90}$ ) total mortality (Haverly & Dell 1983, Su et al. 1987).  $LT_{50}$  can be estimated by setting  $a(d) = \log(-\log(1 - 0.5)) = -0.366$  in Equations 10 or 11. For  $LT_{90}$   $a(d) = 0.834$ . For example, Equation 10 becomes

$$\log_{10}(LT_{50}) = \frac{-0.366 - \hat{\beta} \log_{10}(d_i)}{\tau} \quad (12)$$

It is seen from Equation 12 that  $LT_{50}$  is a decreasing function of dose except when the slope  $\hat{\beta} \leq 0$  or when  $\tau_i = \tau$  for all time points. These two cases are rarely encountered in practice because  $\tau_i = \tau$  means that all insects die at exactly the same moment, whereas  $\hat{\beta} \leq 0$  means that dose either has no effect or has a negative effect on mortality. A third special case is when  $LT_{50}$  is equal to the smallest observed time for all doses. This is usually an indication that the speed of lethal action is shorter than the smallest observed time. Therefore, as long as mortalities increase with increasing doses,  $LT_{50}$  will decrease with increasing doses regardless of the effect of dose on the speed of lethal action. For these reasons, we recommend that plots of  $SLT_{50}$  (and not  $LT_{50}$ ) be used when studying effects of dose on speed of death.

Hypotheses Tests. Suppose that two groups of insects are tested with the same insecticide, or that one insect species is tested with two different insecticides. The CLL line (or linear predictor) of the mortality probabilities for any given time  $t_i$  can then be modeled by

$$\tau_i^k + \beta_i \log_{10}(d_i) \quad (13)$$

where  $k = 1, 2$  refers to the two groups of insects or two toxicants.

To test for significant differences in the responses of the two groups to the insecticides, tests of parallelism and equality of the CLL lines can be done as follows: Define

$$H_1: \beta_1 = \beta \text{ for all } k$$

and

$$H_2: \tau_k = \tau_i \text{ for all } k.$$

If  $H_1$  is not rejected, then the CLL lines are parallel. As in binary probit models, if the CLL lines are parallel, then the relative potency of the two groups (or two toxicants) is constant at all levels of response. If neither  $H_1$  nor  $H_2$  is rejected, then the CLL lines are equal and the difference in the responses of the two groups (or to the two treatments) is not significant.

Goodness-of-Fit. Goodness-of-fit of CLL curves to our data sets was assessed by examining graphs of observed (empirical) and expected conditional mortality probabilities ( $q_i$ ) plotted against the linear predictors  $\tau_k + \beta_i \log_{10}(d_i)$ . Plots were generated by dividing the sample (with class intervals on the linear predictor) into approximately 30 cells with equal number of observations per cell and plotting the observed response rate for each class against the average linear predictor in that class.

## Topical Application

## Diet Incorporation

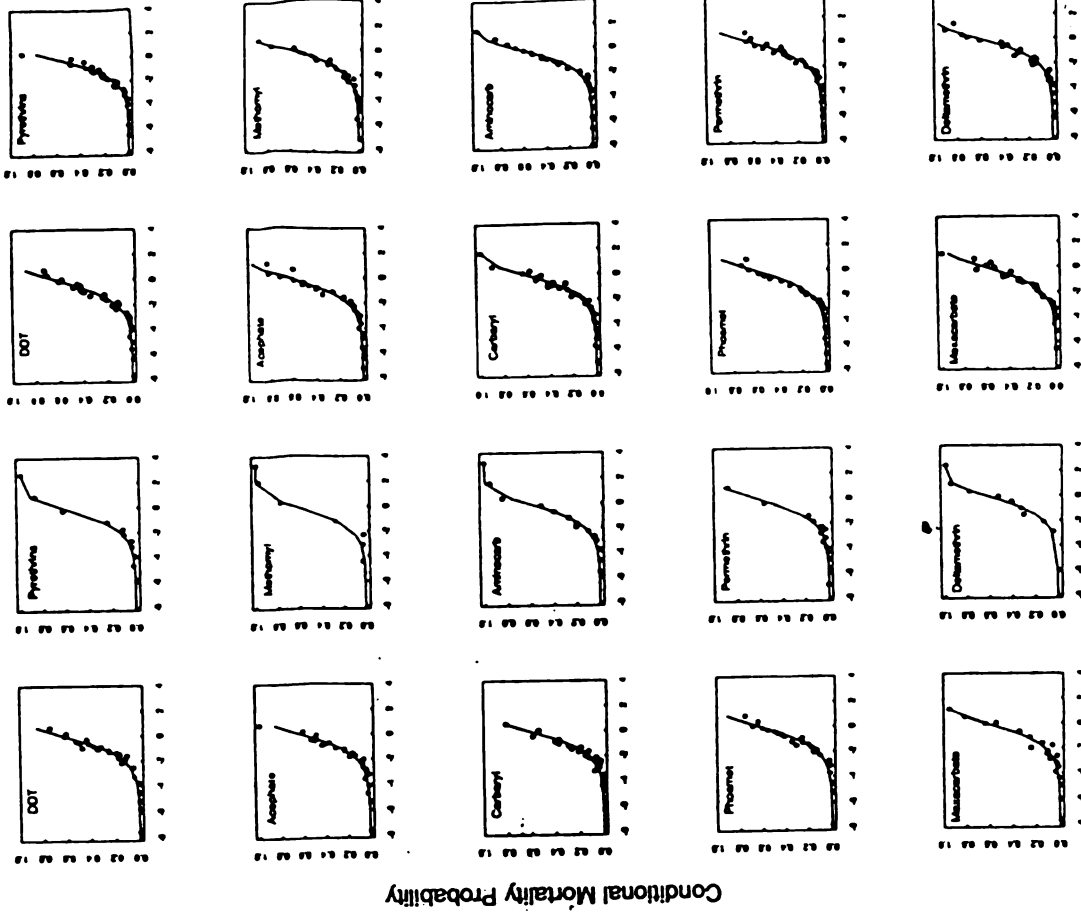


Fig. 1. Plots of observed (empirical) conditional mortality probabilities of western spruce budworm Smooth curves through the points are the fitted CLL curves given by Equation 2

## Linear Predictor

Although empirical probability plots provide one means to assess the adequacy of the CLL curves, they cannot be used to test the adequacy of the binomial distribution. The latter was studied by comparing deviance values (as produced by GLIM) from each data set with the corresponding value from the  $\chi^2$  table (McCullagh & Nelder 1983, 24-26). The deviance,  $D_p$ , is a linear function of the log likelihoods,  $l(r_i; q_i)$ , i.e.,

$$D_p = \sum_{i=1}^n D_{p_i} \\ = -2 \sum_{i=1}^n [l(r_i; q_i) - l(r_i; r_i/n_i)]$$

where  $l(r_i; r_i/n_i)$  is the maximum likelihood achievable for an exact fit. In classical regression models with normal errors, deviance is equivalent to the residual sum of squares. Individual deviance values,  $D_{p_i}$ , can be used to detect outliers. For example, plots of  $D_{p_i}$  against covariates such as dose, time, or sex will identify data points that contribute large values to the overall deviance. In experiments in which the fit of CLL curves was adequate but the deviance indicated the presence of extra-binomial variability, variances of the parameters were multiplied by the heterogeneity factor (by use of the scale option in GLIM [Williams 1982]). Another method for incorporating extra-binomial variability is the random effect model suggested by Preisler (1988).

### Results and Discussion

All data for topical application experiments were fit adequately by CLL curves (Fig. 1). The binomial distribution was adequate (i.e., deviances were not significant at the 5% level [Table 1]) in 7 of the 10 experiments. In each of the three experiments with significant deviances, the deletion of two to four outliers (out of a total of 240 or more data points) made the resulting deviance insignificant. Deviance statistics for the diet data, however, were significant in all but 1 of the 10 experiments (Table 2). Addition of a dose  $\times$  time interaction term to the CLL line improved the fit in only two experiments (acephate and phosmet). However, the final deviances (acephate,  $D_p = 374$ ,  $df = 222$ ; phosmet,  $D_p = 325$ ,  $df = 278$ ) were still too large. Data from diet incorporation experiments apparently tended to include extra sources of variation that could not be accounted for by the binomial model. In topical application experiments, each insect is treated separately and the response of insects to the treatment is therefore likely to be independent. However, when a toxicant is added to the diet, responses of insects eating the same preparation of diet in the same container are likely to be correlated and might cause the overdispersion that we observed

In each of the experiments, significant differences were largest among replicates. CLL lines from replicates were parallel but not equal. Because of the differences observed between replicates, the equation  $r_i + \beta \log(d_i)$  was used for the CLL line, where  $r_i$  varies over the time periods and  $k$  refers to the different replicates (i.e., a separate intercept was fitted for each replicate at each time point). CLL lines for males and females were parallel in all comparisons except one (DDT, diet incorporation) and equal in 12 of the 20 cases (Tables 1 and 2).

In topical and diet experiments, speed of lethal action tended to decrease with increasing amounts of the toxicant (Fig. 2). The effect of dose on speed of action could not be studied in those cases where the median lethal time was  $< 4$  h (i.e., methoxychlor, pyrethrin, methomyl, aminocarb, permethrin, and deltamethrin applied topically) because we would have to extrapolate outside the range of time points actually observed. The rate at which any insecticide caused mortality was faster by topical application (Fig. 3). The chemicals that acted fastest—methoxychlor, pyrethrin, methomyl, aminocarb, permethrin and deltamethrin—were very toxic within the first 4 h after application. The dose required to obtain 90% mortality for these six insecticides, when administered topically, changed very little during the 72 h of the experiment (Table 1).  $LD_{90}$ 's of topically applied DDT, acephate, carbaryl, or phosmet (the insecticides that acted most slowly) decreased rapidly within the first 48 h. Differences between chemicals that acted quickly versus those that acted slowly may reflect differences in absorption through the cuticle or differences in time required for the toxicant to block receptor sites. In contrast, rates of decrease of  $LD_{90}$  in diet incorporation experiments were more gradual. This result was expected because amount of toxicant ingested depended on the insects' continued feeding. Deltamethrin required the lowest dose or concentration to produce 90% mortality in the shortest time, both when applied topically or when included in the diet. Pyrethrin, however, was effective very quickly when administered topically but acted slowly when ingested in the diet.

In time-mortality studies, attempts are often made to characterize the distribution of times to death (Hewlett 1974, Dell et al. 1983). With our model, this required finding a functional form (such as the logarithm of time) for the categorical variables  $r_i$ . For example, if the logarithmic transformation is appropriate (i.e., if  $r_i = \tau \log(t_i)$ ), this (together with Equation 1) suggests that the Weibull function gives a good approximation to the distribution of times to death. Plots in Fig. 2 indicate that no one function could be adequate to describe all these relationships simultaneously. For example, the logarithm of time might be an appropriate transformation for the DDT or the acephate diet data, but not for the carbaryl diet data (which already seem to be linear). Graphs for the

Table 1. Time-dose-mortality regressions for insecticides topically applied to last instar western spruce budworm

Insecticide	Sex	$\hat{\beta} \pm SE$	$LD_{90}$ (95% CL) at 12 h	$LD_{90}$ (95% CL) at $> 48$ h <sup>a</sup>	Scaled deviance <sup>b</sup>	df
DDT	M	1.87 $\pm$ 0.14	14.5 (9.6-21.9)	3.8 (2.0-6.8)	397.4*	223
	F	1.45 $\pm$ 0.13	8.9 (6.0-13.1)	3.6 (2.8-4.6)		
Acephate	M	1.76 $\pm$ 0.17	17.1 (11.6-25.4)	6.5 (4.8-8.8)	300.2*	237
	F	1.56 $\pm$ 0.14	11.1 (7.7-16.0)	4.8 (3.5-6.7)		
Carbaryl	M	1.38 $\pm$ 0.16	24.8 (14.4-42.5)	13.8 (8.7-21.9)	285.9	266
	F	1.25 $\pm$ 0.13	11.8 (5.3-26.5)	7.8 (4.0-15.4)		
Phosmet	M	1.87 $\pm$ 0.12	23.5 (14.0-39.4)	10.2 (6.7-15.3)	241.1	236
	F	1.08 $\pm$ 0.10	10.2 (6.9-15.1)	10.2 (6.9-15.1)		
Methoxychlor	M	2.33 $\pm$ 0.24	0.29 (0.18-0.47)	0.25 (0.16-0.40)	251.5*	178
	F	3.02 $\pm$ 0.29	0.22 (0.13-0.37)	0.18 (0.11-0.30)		
Pyrethrin	M	2.68 $\pm$ 0.31	0.03 (0.01-0.06)	0.03 (0.01-0.07)	111.3	186
	F	3.02 $\pm$ 0.35	0.03 (0.01-0.07)	0.03 (0.01-0.07)		
Methomyl	M	3.49 $\pm$ 0.38	0.13 (0.07-0.23)	0.11 (0.06-0.21)	35.9	103
	F	3.40 $\pm$ 0.38	0.13 (0.10-0.17)	0.13 (0.10-0.17)		
Aminocarb	M	4.59 $\pm$ 0.43	0.15 (0.10-0.22)	0.14 (0.09-0.20)	150.9	139
	F	4.23 $\pm$ 0.38	0.15 (0.10-0.22)	0.14 (0.09-0.19)		
Permethrin	M	2.79 $\pm$ 0.31	0.08 (0.05-0.13)	0.08 (0.05-0.13)	117.4	158
	F	3.11 $\pm$ 0.31	0.06 (0.03-0.09)	0.06 (0.03-0.09)		
Deltamethrin	M	1.14 $\pm$ 0.14	0.021 (0.004-0.013)	0.0017 (0.0003-0.008)	86.0	107
	F	1.93 $\pm$ 0.29	0.007 (0.001-0.007)	0.0065 (0.001-0.004)		

<sup>a</sup> The category  $> 48$  hours was used in those experiments where no change in the  $LD_{90}$  was observed after 7 hours.

<sup>b</sup> \*, the scaled deviance is significant at  $P = 0.05$ .

topical application experiments might be approximated best by two straight lines (one line with a high slope for the first 4 or 12 h and a second line with zero slope for the remainder of the experiment).

The methods that we described are more efficient and far more flexible than those previously

described in the literature (e.g., Dell et al. 1983, Su et al. 1987). Data for our experiments could not be adequately analyzed with the three-parameter Weibull function, as used by Dell et al. (1983). In fact, development of our procedure was prompted by these problem data. Use of the CLL model for time-dose-mortality data should permit efficient

Table 2. Time-dose-mortality regressions for insecticides incorporated into diet fed to last instar western spruce budworm

Insecticide	Sex	$\hat{\beta} \pm SE$	$LD_{90}$ (95% CL) at 1 d	$LD_{90}$ (95% CL) at 3 d	Scaled deviance <sup>b</sup>	df
DDT	M	1.87 $\pm$ 0.19	4.6 (1.8-11.6)	1.0 (0.7-1.7)	304.6	244
	F	2.42 $\pm$ 0.25	6.2 (1.7-22.6)	1.6 (1.0-2.4)		
Acephate	M	2.55 $\pm$ 0.27	4.2 (3.0-5.9)	1.0 (0.8-1.4)	453.1	222
	F	2.53 $\pm$ 0.30	4.3 (3.2-5.7)	1.0 (0.8-1.4)		
Carbaryl	M	1.32 $\pm$ 0.15	62.4 (24.5-277.0)	18.5 (9.6-35.6)	345.1	255
	F	1.05 $\pm$ 0.18	43.6 (13.0-145.0)	12.2 (6.3-23.9)		
Phosmet	M	2.05 $\pm$ 0.28	75.4 (42.2-143.0)	9.5 (6.3-14.3)	380.7	274
	F	2.67 $\pm$ 0.31	60.3 (38.1-95.3)	9.6 (5.5-16.6)		
Methoxychlor	M	1.87 $\pm$ 0.17	0.24 (0.16-0.36)	0.06 (0.03-0.09)	329.4	249
	F	2.03 $\pm$ 0.18	0.22 (0.14-0.36)	0.04 (0.02-0.07)		
Pyrethrin	M	1.26 $\pm$ 0.14	19.1 (11.9-30.6)	5.9 (3.7-9.1)	302.6	268
	F	1.61 $\pm$ 0.17	21.3 (11.4-40.4)	13.8 (8.5-20.1)		
Methomyl	M	2.04 $\pm$ 0.16	7.6 (5.1-11.1)	2.9 (2.0-4.1)	323.0	226
	F	1.74 $\pm$ 0.14	8.2 (5.3-12.7)	3.0 (2.1-4.2)		
Aminocarb	M	2.28 $\pm$ 0.19	1.31 (0.98-1.53)	0.47 (0.32-0.68)	281.1	219
	F	2.18 $\pm$ 0.18	1.63 (1.11-2.40)	0.56 (0.39-0.82)		
Permethrin	M	2.47 $\pm$ 0.25	1.22 (0.98-1.53)	0.59 (0.48-0.73)	366.6	254
	F	2.64 $\pm$ 0.27	2.28 (1.41-3.70)	0.96 (0.74-1.25)		
Deltamethrin	M	2.12 $\pm$ 0.21	0.14 (0.008-0.032)	0.007 (0.000-0.009)	270.9	207
	F	1.58 $\pm$ 0.15	0.11 (0.005-0.026)	0.008 (0.000-0.018)		

\* Each of the scaled deviances in this table is significant at  $P = 0.05$ .

Topical Application

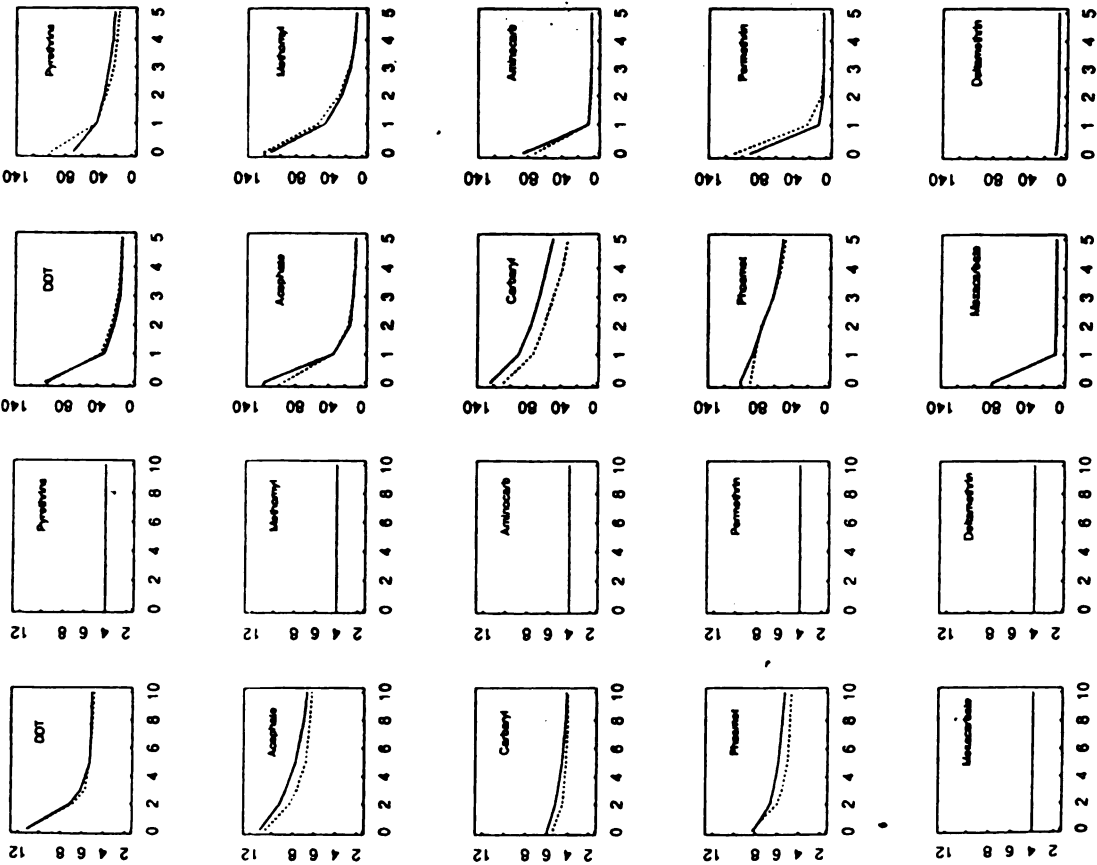


Fig. 2. Estimated median times between exposure and death (SLT<sub>50</sub>) of last instar western spruce budworm plotted against increasing doses (topical application) and concentrations (diet application) of 10 insecticides. Males (—); females (---). Curves were truncated at 4 h (the minimum time at which an observation was made).

Diet Incorporation

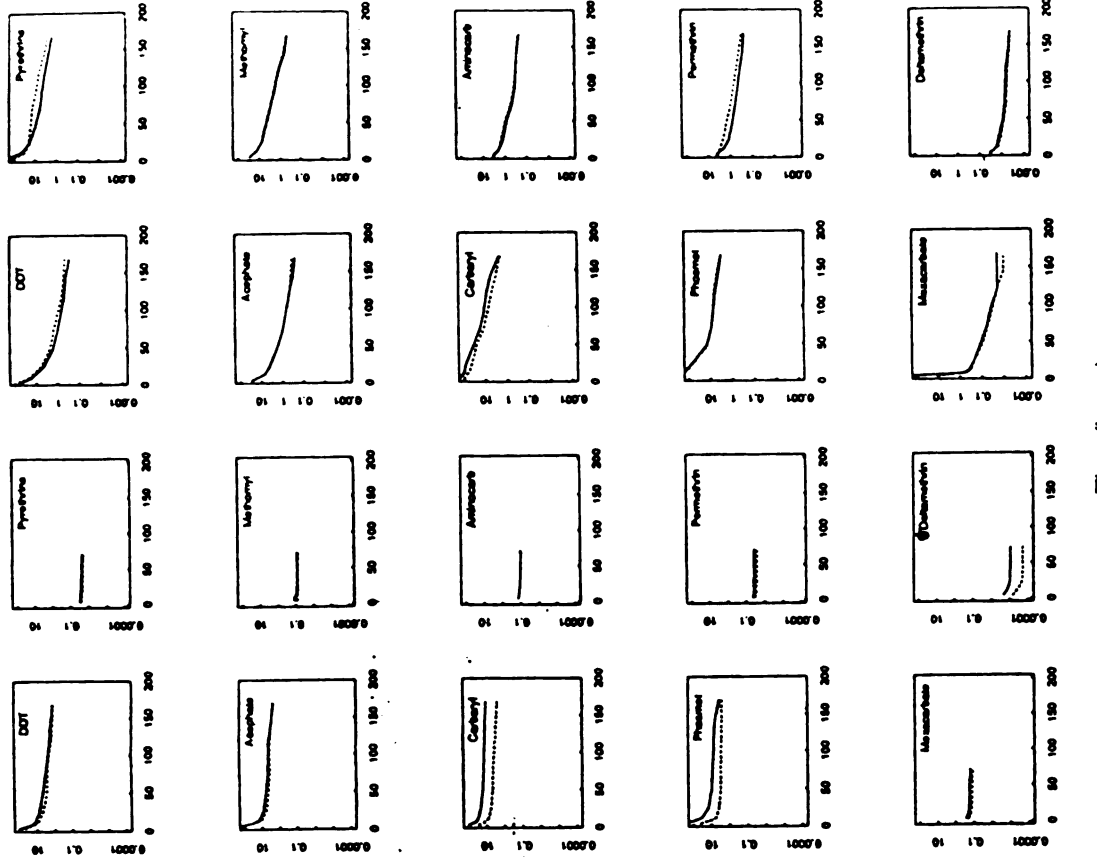


Fig. 3. Estimated curves of LD<sub>90</sub> (topical application) and LC<sub>90</sub> (diet incorporation) in last instar western spruce budworm observed at increasing times after exposure. Lethal doses (or concentrations) are on logarithmic scale. Males (—); females (---).

analyses and eliminate problems involved in describing dose and time trends separately in relation to mortality in an experimental population

#### References Cited

- Alvey, N. G., N. Calvey & P. Lane. 1982. An introduction to GENSTAT Academic. New York.
- Bentley, N. R. 1978. A survival model for a wood preservative trial. *Biometrics* 34: 673-679.
- Christensen, E. R. & C. Chen. 1985. A general non-interactive multiple toxicity model including probit, logit, and Weibull transformations. *Biometrics* 41: 711-725.
- Dell, T. R., J. L. Robertson & M. I. Haverly. 1983. Estimation of cumulative change of state with the Weibull function. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 29: 38-40.
- Haverly, M. I. & T. R. Dell. 1983. Time trends in mortality of *Conophthorus ponderosae* (Hopkins) exposed to insecticide residues. *Pestic. Sci.* 15: 369-374.
- Haverly, M. I. & J. R. Wood. 1981. Residual toxicity of eleven insecticide formulations to the mountain pine cone beetle, *Conophthorus monticolae* Hopkins. *J. Ga. Entomol. Soc.* 16: 77-83.
- Hewlett, P. S. 1974. Time from dosage to death in beetles, *Tribolium castaneum*, treated with pyrethrin or DDT, and its bearing on dose-mortality relations. *J. Stored-Prod. Res.* 10: 27-41.
- Lehmann, E. L. 1966. Testing statistical hypothesis. Wiley, New York.
- McCullagh, P. & J. A. Nelder. 1983. Generalized linear models. Chapman & Hall, New York.
- Payne, C. D. [ed.]. 1986. The GLIM system release 3.77 manual. Numerical Algorithms Group, Oxford, U.K.
- Preisler, H. K. 1988. Assessing insecticide bioassay data with extra binomial variation. *J. Econ. Entomol.* 81: 759-765.
1989. Analysis of a toxicological experiment using a generalized linear model with nested random effects. *Int. Stat. Rev.* 57: 145-160.
- Robertson, J. L. 1979. Rearing the western spruce budworm. USDA, Washington, D.C.
1980. Contact and feeding toxicities of acephate and carbaryl to larval stages of the western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 112: 1001-1006.
- Robertson, J. L., N. E. Savin & R. M. Russell. 1981. Weight as a variable in the response of western spruce budworm to insecticides. *J. Econ. Entomol.* 74: 643-650.
- Savin, N. E., J. L. Robertson & R. M. Russell. 1977. A critical evaluation of bioassay in insecticide research: likelihood ratio tests of dose-mortality regression. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 23: 257-266.
- Shapiro, M., H. K. Preisler & J. L. Robertson. 1987. Enhancement of nucleopolyhedrovirus virus activity on Eypas moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by chitinase. *J. Econ. Entomol.* 80: 1113-1116.
- Su, N.-Y., M. Tamashiro & M. I. Haverly. 1987. Characterization of slow-acting insecticides for regional control of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 1-4.
- Tukey, J. W., J. L. Clausen & J. F. Heyse. 1985. Testing the statistical certainty of response to increasing doses of a drug. *Biometrics* 41: 285-301.
- Williams, D. A. 1982. Extra-binomial variation in logistic linear models. *Appl. Stat.* 31: 144-148.

Received for publication 10 October 1988; accepted 5 April 1989.

## Field Bioassay to Evaluate Contact and Residual Toxicities of Insecticides to Carabid Beetles (Coleoptera: Carabidae)

KEVIN D. FLOATE,<sup>1</sup> R. H. ELLIOTT,<sup>1</sup> JOHN F. DOANE,<sup>1</sup>  
AND CEDRIC GILLOTT<sup>2</sup>

Research Station, Agriculture Canada,  
Saskatoon, Saskatchewan S7N 0X2, Canada

*J. Econ. Entomol.* 82(6): 1543-1547 (1989)

**ABSTRACT.** A 2-yr field study evaluated the effects of selected insecticides on *Bembidion placurellum* Motschulsky and *Bembidion quadrimaculatum* L., carabid predators of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin). A bioassay method using caged beetles indicated that insecticides differed significantly in their contact and residual toxicities when applied at maximum recommended field rates. Deltamethrin, the least toxic insecticide, caused approximately 30% mortality in both beetle species, but its residual toxicity on the soil remained constant for 1 wk (12% mortality). Carbofuran and chlorpyrifos, the deltamethrin but less toxic after 1 wk (100% mortality). After 1 wk, the residual toxicity of most toxic contact sprays, caused 83 to 100% mortality whereas the toxicity of chlorpyrifos re-carbofuran had declined markedly (5% mortality) whereas the toxicity of evaluating the pitfall remained high (82% mortality). Pitfall trapping was an inconclusive method of evaluating the toxicity of insecticidal sprays to carabid adults. In plots treated with carbofuran, pitfall catches of *Bembidion* species were not significantly different from those in control plots during a 6-wk period after spraying. In plots treated with chlorpyrifos, catches of *Bembidion* species were significantly lower than those in control plots 3-16 d after spraying, but not thereafter. Results suggested that adult immigration and residual toxicity influence pitfall catches and recovery of carabid populations after spraying.

**KEY WORDS.** Insects, field bioassay, contact toxicity, residual toxicity

AN OUTBREAK of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin), in northeastern Saskatchewan in 1983 caused yield losses in spring wheat estimated at \$30 million (Offert et al. 1985). The outbreak stimulated research on an integrated pest management (IPM) program involving chemical, cultural, and biological controls. *Bembidion obscurum* Motschulsky and *B. quadrimaculatum* L. were identified as the predominant carabid predators of wheat midge (Floate 1987). Here we report results of investigations to assess the effects of chemical sprays on both species.

Although pitfall traps have been used extensively to evaluate the effects of insecticides on field populations of carabid beetles, results have been conflicting. Numbers of trapped beetles in plots treated with insecticide can be higher than (Edwards & Thompson 1975; Chiverton 1984), lower than (Edwards & Thompson 1975; Basedow et al. 1976; Powell et al. 1985; Matcham & Hawkes 1985; Shires 1985a,b), or not different from (Cockfield & Potter 1983, 1984; Powell et al. 1985) those in untreated plots. However, pitfall catches, which reflect abun-

dance and activity (Thiele 1977), may not provide an accurate indication of toxicological effects when insecticides increase activity directly (Edwards & Thompson 1975) or indirectly through prey reductions (Chiverton 1984). Furthermore, in small plot evaluations, toxicity may be masked by movement between plots or immigration from outside areas (Powell et al. 1985). Plot barriers may deter interplot movement but not eliminate it entirely (Matcham & Hawkes 1985). If immigration is important in the reestablishment of carabid beetles in sprayed areas, then recovery should also depend on the residual toxicity of insecticides to immigrating beetles.

The objectives of our study were to develop a field bioassay for assessing the contact and residual toxicities of selected insecticides against two *Bembidion* species, and to compare these findings with those obtained from pitfall traps.

#### Materials and Methods

The first test was done in a wheat field on sandy-loam soil near Aylsham, Saskatchewan, in 1984. Plots (5 by 30 m) separated by an unsprayed buffer zone (1.8 m wide) were arranged in a randomized complete block design with four replicates. Chemical treatments were applied 17 July at a volume of 100 liters/ha using a pull-type sprayer (Hardi

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan S7N 0W0, Canada.

<sup>2</sup> Agriculture Canada Research Station, Saskatoon, Saskatchewan S7N 0X2, Canada.

To whom correspondence should be addressed.



Biolect

E-0142

0142

029

### Quantitative Aspects of Nuclear Polyhedrosis Virus Infections in Lepidopterous Larvae: The Dose-Survival Time Relationship

NIKOLAI A. M. VAN BEEK, H. ALAN WOOD, AND PATRICK R. HUGHES

*Insect Pathology Resource Center, Boyce Thompson Institute for Plant Research at Cornell University, Ithaca, New York 14853*

Received July 14, 1987; accepted September 15, 1987

Dose-survival time relationships are presented for neonate larvae of *Heliothis zea* inoculated with *H. zea* singly embedded nuclear polyhedrosis virus (HzSNPV) and *Trichoplusia ni* inoculated with the 1A clone of *Autographa californica* multiply embedded NPY, the HOB-mutant of this clone, or *T. ni* SNPV. For each of these virus-host combinations, plots of median survival time (ST) against logarithm of the inoculum concentration have the shape of an inverted sigmoid curve. The plateau of ST<sub>50</sub> values at low doses is interpreted as resulting from the dose received by responding larvae remaining constant while the proportion of treated larvae receiving this dose decreases; evidence is presented that the plateau values at high doses are not produced by saturation of virus receptor sites on the midgut epithelium. A close similarity was noted between the dose-survival time relation of baculoviruses and their hosts on the one hand, and that of vertebrate pathogens and their hosts on the other; for the latter, mathematical models with predictive power have been developed. © 1988 Academic Press, Inc.

**KEY WORDS:** *Heliothis zea*; *Trichoplusia ni*; nuclear polyhedrosis virus; dose-survival relationships; baculovirus; AcMNPV; TnSNPV; HzSNPV.

#### INTRODUCTION

The effectiveness of baculoviruses in the control of pest insects can be evaluated either by the proportion of the treated insects killed or by the survival time of the infected insects. The survival time of infected larvae has received relatively little attention, in part because of difficulties inherent in the use of surface contamination assays (Ignoffo, 1965, 1966) for determining survival time responses. In such assays, larvae are exposed continuously or for a considerable length of time to the inoculum and, thus, accurate assessment of zero time and dose received cannot be made (Hughes and Wood, 1981; Evans, 1981). Several variations of the surface contamination assay have been developed (e.g., Chauthani, 1968; Potter et al., 1978; Boucias et al., 1980), but they are subject to the same drawbacks as the original method with respect to survival time determination. The droplet feeding method (Hughes et al., 1986) permits the infection

of neonate lepidopterous larvae within a short time interval (20 min) and more precise determination of the dose received (Van Beek and Hughes, 1986). A second problem has been the lack of a consensus on the appropriate statistical analysis of survival time data. As noted by Allaway and Payne (1984), most researchers have used a method (Bliss, 1937) which is based on the assumption that the density function of survival times is experimentally truncated (i.e., that the test was terminated before all responses occurred). This might be appropriate when late instars are inoculated with low doses or when virus multiplication is extremely slow, but certainly it is inappropriate when those larvae that do not respond simply have escaped infection. For this reason, the majority of the survival time studies reported in the literature probably should not have been considered as being experimentally truncated. Analysis of survival time data by Allaway and Payne (1984) resulted in what they called "infection-course" LT<sub>50</sub>s.

which can be compared with those calculated by Hughes and Wood (1981) and Hughes et al. (1983).

In this communication we present the dose-survival time relationships of four baculovirus-host combinations and discuss the meaning of deviations from linearity at extreme low and high concentrations. Further, we draw attention to the shape of the dose-survival time curves as being very similar to those of vertebrate hosts (Meynell and Meynell, 1958) for which mathematical models have been developed (Saaty, 1961; Williams, 1965a,b; Armitage et al., 1965; Shortley and Wilkins, 1965; Shortley, 1965).

#### MATERIALS AND METHODS

**Insects.** Laboratory colonies of *Trichoplusia ni* and *Heliothis zea* were maintained as described by Hughes and Wood (1981). Neonate larvae for bioassay were obtained from sterilized eggs incubated at temperatures chosen to ensure hatching of larvae 3 days after collection (ca. 24° and 26°C for *T. ni* and *H. zea*, respectively).

**Viruses.** Propagation and purification of the IA clone of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), the HOB mutant of this clone, and *T. ni* singly embedded NPV (TnSNPV) were as previously described by Wood (1980) and Wood et al. (1981), except that diseased larvae were collected in 1% SDS rather than in 1% 2-mercaptoethanol and vacuum infiltration was not used. HzSNPV was propagated in *H. zea* larvae inoculated with an Elcar preparation (Granados et al., 1981) and purified as described for AcMNPV and TnSNPV. Occlusion body (OB) concentrations in the stock suspensions were determined by counting appropriate dilutions in a hemacytometer.

Ultraviolet-inactivated virus for the competition experiment was obtained by placing a suspension of  $8.5 \times 10^8$  OBs/ml of AcMNPV-HOB on coverslips, allowing it to dry, and then exposing it for 12 hr to a source generating UV radiation of wave-

lengths below 260 nm with energy of 800 erg sec<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>. The coverslips were then placed in a tube to which the original volume of water was added and the OBs were resuspended by sonification.

**Bioassays.** Three- to six-hour-old neonate larvae were selected for vigor (Wood et al., 1981) and inoculated with virus according to the modified droplet feeding method (Hughes et al., 1986). In experiments with HzSNPV, the average volume ingested was determined with a sodium fluorescein solution according to Van Beek and Hughes (1986). OB-containing solutions ranged from  $1 \times 10^4$  to  $4 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^4$  to  $4 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^4$  to  $1 \times 10^{11}$ , and  $3 \times 10^4$  to  $4 \times 10^{10}$  OBs/ml for AcMNPV-IA, AcMNPV-HOB, TnSNPV, and HzSNPV, respectively. Typically, each concentration was employed in two assays and the whole range was covered by two or three assays containing alternating concentrations of OBs. Thirty to fifty larvae were inoculated at each concentration except at the lowest ones in which up to 400 larvae were used to obtain at least ten responding individuals. Treated larvae were placed individually in cups and incubated at 29°C; mortality was checked approximately every 6 hr from about 12 hr prior to the time of first mortality until at least 24 hr after the last infected larva died. The low numbers of larvae that died during molting were excluded from the survival time analysis and data were analyzed with a logit version of Bliss's (1937) probit model as previously described (Hughes et al., 1983).

The possibility of saturating virus-specific receptors on midgut cells with high doses of virus was investigated in a competition experiment by comparing mortality of *T. ni* larvae inoculated with HOB virus either alone or in combination with a high concentration of the same virus inactivated by UV light. The preparations assayed were (1) active AcMNPV-HOB ( $7.6 \times 10^5$  OBs/ml), (2) UV-inactivated AcMNPV-HOB ( $5 \times 10^9$  OBs/ml), and (3) a suspension containing  $7.6 \times 10^5$  OBs/ml of the ac-

tive virus and  $5 \times 10^9$  OBs/ml of the inactive virus. Volumes ingested were determined by the fluorescein method as before. An additional group of larvae was fed fluorescein solution containing  $5 \times 10^9$  OBs/ml of the UV-inactivated virus to assure that the high concentration of inactive virus did not affect ingestion.

### RESULTS AND DISCUSSION

For all virus-host combinations, the median survival time ( $ST_{50}$ ) generally decreased with increasing concentration of inoculum, yielding an inverse sigmoid curve when plotted against the natural logarithm of inoculum concentration (Figs. 1, 2). Plots of the dose-response results from the same assays show that the  $ST_{50}$  starts to level off at concentrations killing less than approximately 80% of the larvae (Figs. 1, 2). This can be explained if the OBs are considered to follow a Poisson distribution in the ingested volume (Hughes et

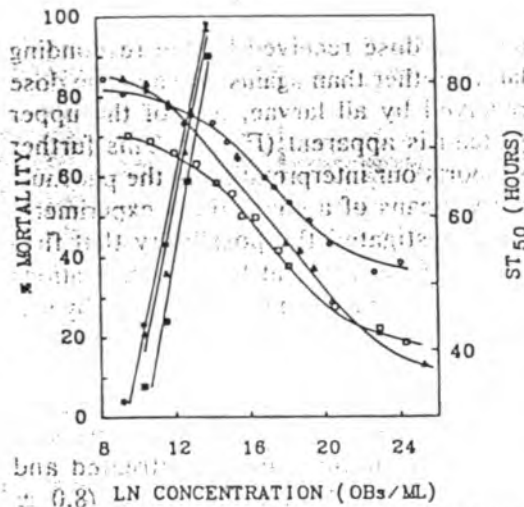


FIG. 1. Dose-survival time responses (open symbols) and dose-mortality responses (solid symbols) of neonate *Trichoplusia ni* larvae inoculated with AcMNPV-IA (O), AcMNPV-HOB (□), or TnSNPV (Δ) at various concentrations. The  $ST_{50}$  values were determined in three to six assays, usually resulting in duplicate  $ST_{50}$  values at each concentration. Standard errors of the  $ST_{50}$  values range from 0.5 to 1.1 hr at high and intermediate concentrations and up to 3.5 hr at the lowest concentrations.

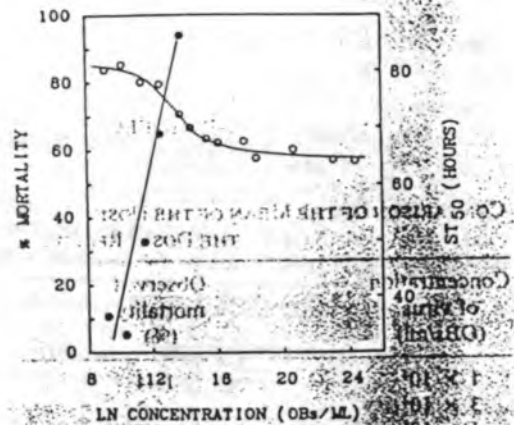


FIG. 2. Dose-survival time responses (open circles) and dose-mortality responses (solid circles) of neonate *Heliothis zea* larvae inoculated with HzSNPV at various concentrations. The  $ST_{50}$  values were determined in four assays and each value except those of the two lowest and the three highest concentrations represents the average of two determinations. Standard errors of the  $ST_{50}$  values range from 0.5 to 1.8 hr at high and intermediate concentrations and up to 8 hr at the lowest concentrations.

al., 1984; Huber and Hughes, 1984). Under such conditions, as inoculum concentration decreases below that causing 100% mortality, responding larvae would receive higher doses than the average since an increasing proportion of the larvae would receive zero OBs. At inoculum concentrations causing less than ca. 50% mortality, responding larvae would receive essentially a constant dose (Meynell and Meynell, 1958). To illustrate this effect, Table 1 summarizes the calculated mean dose received by responding *H. zea* larvae alone (i.e., excluding from the average those individuals receiving zero OBs), assuming a Poisson distribution of OBs in the inoculum; the number of OBs received by individual larvae was calculated under the assumption that all the larvae ingested the measured average volume of inoculum. This calculated mean differs increasingly from the average dose received by all larvae as the concentration is decreased and a greater proportion of the larvae receives zero OBs. The mean dose received by responding

NPV INFECTIONS IN LEPIDOPTEROUS LARVAE

TABLE 1

COMPARISON OF THE MEAN OF THE DOSES RECEIVED BY TREATED *Heliothis zea* LARVAE WITH THE MEAN OF THE DOSES RECEIVED BY RESPONDING LARVAE ALONE

Concentration of virus (OBs/ml)	Observed mortality (%)	Mean dose for all larvae (OBs/larva)	Calculated mean dose received by responding larvae (OBs/larva)
$1 \times 10^4$	11.4	0.16	1.1
$3 \times 10^4$	5.2	0.35	2.1
$1 \times 10^5$	34.5	1.32	2.6
$3 \times 10^5$	66.4	3.92	3.7
$1 \times 10^6$	92.9	13.26	3.7
$2 \times 10^6$	100.0	30.24	3.7
$1 \times 10^7$	100.0	151.2	3.7

\* The mean dose received by responding larvae was calculated under the assumption that OBs present per volume ingested by individual larvae (8 nl) follows a Poisson distribution. For each inoculum concentration the proportion of the larval population receiving  $x$  OBs ( $x = 0, 1, 2, \dots, n$ ) was calculated using the formula:  $P(x) = e^{-\mu} \mu^x / x!$ , where  $\mu$  is the average number of OBs per volume ingested. Assuming that the responding larvae were those that received the greater numbers of OBs, the Poisson probabilities were summed from the highest value of  $x$  toward the lowest until the proportion equaled the proportion responding, and the mean number of OBs represented in these classes was used as the mean dose received by responders.

larvae tends to constancy and approaches 2 OBs/larva at concentrations causing <50% mortality (i.e., at concentrations  $< 1 \times 10^5$  OBs/ml); mortality at the lowest concentration was unusually high, giving rise to a low calculated dose of 1.1 OBs. When  $ST_{50}$  values are plotted against the logarithm of

average dose received by the responding larvae rather than against the average dose received by all larvae, loss of the upper plateau is apparent (Fig. 3). This further supports our interpretation of the plateau.

By means of a competition experiment, we investigated the possibility that flattening of the curve at high concentrations was due to limitation of virion entry by saturation of virus-specific receptors on the larval midgut epithelium cells. The average volumes ingested of the nontreated AcMNPV-HOB suspension and the suspension containing both nontreated and UV-inactivated OBs did not differ ( $8.0 \pm 0.4$  nl and  $8.2 \pm 0.5$  nl, respectively). No effect of UV treatment on the capacity of OBs to dissolve under alkaline conditions was found when treated OBs were exposed to *T. ni* midgut juice and examined under a light microscope. Presence of the inactivated virus did not affect the response to the nontreated virus (Table 2). Therefore, we conclude that availability of midgut cell receptors is not limiting. Another possible explanation for flattening of the curve at high doses might be that the number of host midgut cell available for entry of the virus is limiting. It could also be argued that the

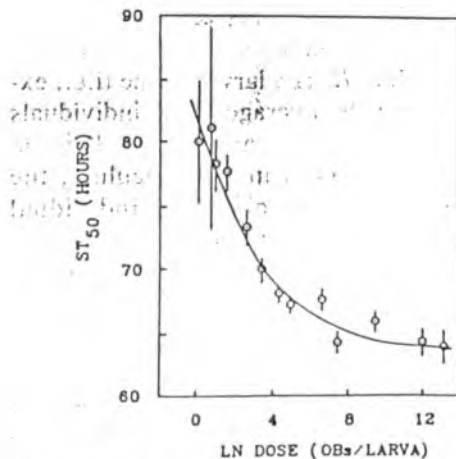


FIG. 3. Median survival-time responses of neonate *Heliothis zea* larvae as a function of the logarithm of the calculated average dose of H<sub>2</sub>SNPV received by those larvae that respond with infection, assuming a Poisson distribution of OBs in the volume of inoculum ingested. Bars indicate that standard errors of the  $ST_{50}$  determinations.

TABLE 2  
EFFECT OF UV-INACTIVATED OBs OF AcMNPV-HOB ON THE INFECTIVITY OF NONTREATED OBs IN NEONATE LARVAE OF *Trichoplusia ni*

Virus concentration (OBs/ml)		Mean dose (OBs/larva) of nontreated virus	No. larvae treated	% Mortality
Nontreated	UV-treated			
$7.16 \times 10^5$	+	0	160	78.1
$7.16 \times 10^5$	+	$5 \times 10^9$	160	78.7
0	+	$5 \times 10^9$	160	2.0

recorded  $ST_{50}$  values at high doses approach the minimum time interval needed for sufficient spread of the virus to cause death of the larva.

The overall shape of the dose-survival time curves, as depicted in Figs. 1 and 2, resembles that obtained from mammalian host-pathogen interactions (Meynell and Meynell, 1958). For the analysis of bioassay data of vertebrates challenged with various pathogens (bacteria, viruses, protozoa, rickettsiae) mathematical models, notably, the independent action and the birth-death models, have been developed (for review, see Shortley and Wilkins, 1965). The birth-death model as an extended version of the independent action model allows the prediction of two important parameters in the course of the infection: (1) the in vivo rate of increase of the pathogen, and (2) the critical amount of the pathogen in vivo that triggers the response. If the birth-death model would be appropriate to analyze dose-survival time relations of baculoviruses and their hosts, it would constitute an additional tool for evaluating key factors in the effectiveness of baculoviruses. Studies currently being completed (N. A. M. van Beek, H. Flore, H. A. Wood and P. R. Hughes, unpubl.) provide strong support for the validity of this model and illustrate its application to the insect-baculovirus relationship.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work was in part supported by USDA Grant 84-CRCR-1-1387.

- #### REFERENCES
- ALLAWAY, G. P., AND PAYNE, C. C. 1984. Host range and virulence of five baculoviruses from lepidopterous hosts. *Ann. Appl. Biol.*, 105, 29-37.
- ARMITAGE, P., MEYNELL, G. G., AND WILLIAMS, T. 1965. Birth-death and other models for microbial infection. *Nature (London)*, 207, 570-572.
- BLISS, C. I. 1937. The calculation of the time-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.*, 24, 815-852.
- BOUCIAS, D. G., JOHNSON, D. W., AND ALLEN, G. E. 1980. Effect of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gematalis* larvae. *Environ. Entomol.* 9, 59-61.
- CHAUTHANI, A. R. 1968. Bioassay technique for insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 11, 242-245.
- EVANS, H. F. 1981. Quantitative assessment of the relationships between dosage and response of the nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 37, 101-109.
- GRANADOS, R. R., LAWLER, K. A., AND BURAND, J. P. 1981. Replication of *Heliothis zea* baculovirus in an insect cell line. *Intervirology*, 16, 71-79.
- HUBER, J., AND HUGHES, P. R. 1984. Quantitative bioassay in insect pathology. *Bull. Entomol. Soc. Amer.*, 30, 31-34.
- HUGHES, P. R., GETTIG, R. R., AND MCCARTHY, W. J. 1983. Comparison of the time-mortality response of *Heliothis zea* to 14 isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 41, 256-261.
- HUGHES, P. R., VAN BEEK, N. A. M., AND WOOD, H. A. 1986. A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 48, 187-192.
- HUGHES, P. R., AND WOOD, H. A. 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 37, 154-159.
- HUGHES, P. R., WOOD, H. A., BURAND, J. P., AND GRANADOS, R. R. 1984. Quantification of the dose-mortality response of *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Spodoptera frugiperda* to nuclear

polyhedrosis viruses: Applicability of an exponential model. *J. Invertebr. Pathol.*, 43, 343-350.

IGNOFFO, C. M. 1965. The nuclear-polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (Fabricius). IV. Bioassay of virus activity. *J. Invertebr. Pathol.*, 7, 315-319.

IGNOFFO, C. M. 1966. Susceptibility of the first-instar of the bollworm, *Heliothis zea*, and the tobacco budworm, *Heliothis virescens* to *Heliothis* nuclear-polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 8, 531-536.

MEYNELL, G. G., AND MEYNELL, E. W. 1958. The growth of microorganisms *in vivo* with particular reference to the relation between dose and latent period. *J. Hyg. (Cambridge)*, 56, 323-346.

POTTER, K. N., JAQUES, R. P., AND FAULKNER, P. 1978. Modification of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus passaged *in vivo*. *Intervirology*, 9, 76-85.

SAATY, T. L. 1961. Some stochastic processes with absorbing barriers. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 23, 319-334.

SHORTLEY, G. 1965. A stochastic model for distributions of biological response times. *Biometrics*, 21, 562-582.

SHORTLEY, G., AND WILKINS, J. R. 1965. Independent-action and birth-death models in experimental microbiology. *Bacteriol. Rev.*, 29, 102-141.

VAN BEEK, N. A. M., AND HUGHES, P. R. 1986. Determination of the volume ingested by neonate lepidopterous larvae using fluorescence spectroscopy. *J. Invertebr. Pathol.*, 48, 249-257.

WILLIAMS, T. 1965a. The basic birth-death model for microbial infections. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 27, 338-360.

WILLIAMS, T. 1965b. The distribution of response times in a birth-death process. *Biometrika*, 52, 581-585.

WOOD, H. A. 1980. Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus proteins. *Virology*, 103, 392-399.

WOOD, H. A., HUGHES, P. R., JOHNSON, L. B., AND LANGRIDGE, W. H. R. 1981. Increased virulence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by mutagenesis. *J. Invertebr. Pathol.*, 38, 236-241.

CHANDLER, A. R. 1963. The development of the birth-death model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 25, 245-247.

WILKINS, J. R. 1963. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 25, 245-247.

WILKINS, J. R. 1965. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 27, 338-360.

WILKINS, J. R. 1966. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 28, 338-360.

WILKINS, J. R. 1967. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 29, 338-360.

WILKINS, J. R. 1968. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 30, 338-360.

WILKINS, J. R. 1969. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 31, 338-360.

WILKINS, J. R. 1970. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 32, 338-360.

WILKINS, J. R. 1971. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 33, 338-360.

WILKINS, J. R. 1972. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 34, 338-360.

WILKINS, J. R. 1973. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 35, 338-360.

WILKINS, J. R. 1974. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 36, 338-360.

WILKINS, J. R. 1975. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 37, 338-360.

WILKINS, J. R. 1976. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 38, 338-360.

WILKINS, J. R. 1977. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 39, 338-360.

WILKINS, J. R. 1978. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 40, 338-360.

WILKINS, J. R. 1979. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 41, 338-360.

WILKINS, J. R. 1980. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 42, 338-360.

WILKINS, J. R. 1981. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 43, 338-360.

WILKINS, J. R. 1982. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 44, 338-360.

WILKINS, J. R. 1983. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 45, 338-360.

WILKINS, J. R. 1984. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 46, 338-360.

WILKINS, J. R. 1985. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 47, 338-360.

WILKINS, J. R. 1986. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 48, 338-360.

WILKINS, J. R. 1987. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 49, 338-360.

WILKINS, J. R. 1988. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 50, 338-360.

WILKINS, J. R. 1989. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 51, 338-360.

WILKINS, J. R. 1990. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 52, 338-360.

WILKINS, J. R. 1991. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 53, 338-360.

WILKINS, J. R. 1992. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 54, 338-360.

WILKINS, J. R. 1993. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 55, 338-360.

WILKINS, J. R. 1994. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 56, 338-360.

WILKINS, J. R. 1995. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 57, 338-360.

WILKINS, J. R. 1996. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 58, 338-360.

WILKINS, J. R. 1997. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 59, 338-360.

WILKINS, J. R. 1998. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 60, 338-360.

WILKINS, J. R. 1999. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 61, 338-360.

WILKINS, J. R. 2000. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 62, 338-360.

WILKINS, J. R. 2001. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 63, 338-360.

WILKINS, J. R. 2002. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 64, 338-360.

WILKINS, J. R. 2003. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 65, 338-360.

WILKINS, J. R. 2004. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 66, 338-360.

WILKINS, J. R. 2005. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 67, 338-360.

WILKINS, J. R. 2006. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 68, 338-360.

WILKINS, J. R. 2007. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 69, 338-360.

WILKINS, J. R. 2008. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 70, 338-360.

WILKINS, J. R. 2009. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 71, 338-360.

WILKINS, J. R. 2010. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 72, 338-360.

WILKINS, J. R. 2011. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 73, 338-360.

WILKINS, J. R. 2012. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 74, 338-360.

WILKINS, J. R. 2013. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 75, 338-360.

WILKINS, J. R. 2014. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 76, 338-360.

WILKINS, J. R. 2015. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 77, 338-360.

WILKINS, J. R. 2016. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 78, 338-360.

WILKINS, J. R. 2017. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 79, 338-360.

WILKINS, J. R. 2018. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 80, 338-360.

WILKINS, J. R. 2019. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 81, 338-360.

WILKINS, J. R. 2020. The birth-death model as an extended version of the independent action model. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 82, 338-360.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by USDA and the University of California, Davis.

## 773 A bioassay was developed for

measuring the activity of conidia of *Nomuraea rileyi* (C. Ignoffo, B. Puttler, J. H. Plettler, and W. Dickerson, *J. Invertebr. Pathol.* 28, 259-262, 1976). Soybean that had been treated by spreading dilutions of conidia on the surfaces following the leaflets to dry were fed to 48 hr old larvae of *Trichoplusia ni*. After 48 hr larvae were transferred to individual cages, held at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , and reared on standard semisynthetic diet (C. Ignoffo, Boening, J. Ecat, *Entomol.* 63, 697, 1970). Mortality was recorded 24 hr later. This technique has also been used to detect the presence and viability of conidia exposed to chemicals, and of conidia in soil, and in the tissue, secretions, and excrement of mammals. Since a continuous supply of leaflets of a specific variety is necessary for this technique we thereupon explored the possibility of using the standard semisynthetic diet rather than leaflets for exposing larvae to conidia. However, preliminary in vitro tests (C. Garcia, Ignoffo, *J. Invertebr. Pathol.* in press) showed that in vivo tests, the antifungal agent formalin, methylparabenzoate, potassium sorbate) present in the diet significantly inactivated conidia: The  $\text{LC}_{50}$  on diets containing antifungal agents was  $>20,000$  conidia/leaflet as compared to  $12$  conidia/ $\text{mm}^2$  on leaflets. But when these agents were present in a dilution of  $1:10$  in the diet, the growth of *A. spergillus* sp. after larvae were exposed to the diets for 2-3 days, was similar to that on the semisynthetic diet ( $121^\circ\text{C}$ ), indicating that instead of using antifungal agents did not improve the sensitivity of the bioassay and an additional step to the procedure.

of a proprietary product in this paper does not constitute an endorsement of this product by the Department of Agriculture. It is associated with  $\bar{x}$  in text are  $\bar{x}$ .

cedure. Thus, it was decided to expose the larvae for 24 hr to the semisynthetic, non-sterilized diet formulated without antifungal agents (three antibacterial agents were left in the diet) since growth of *Aspergillus* sp. was never observed before 48 hr.

**Bioassay.** A milled, lyophilized preparation of conidia of *N. rileyi* was used for the bioassay. The preparation of conidia was a second passage (originally collected from *T. ni* cadavers) grown on Sabouraud maltose agar containing 1% yeast extract (SMA Y). Conidia were harvested from cultures grown in disposable plastic Petri dishes (R. Hamalle, and J. Bell, *J. Ga. Entomol. Soc.* 11, 221-223, 1976). The preparation we used contained  $55.8 \pm 4.9 \times 10^6$  conidia/g.

The cabbage looper larvae used were obtained from a laboratory culture that had been reared on a semisynthetic diet since 1959 (C. Ignoffo, *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 56, 178-182, 1963). Those selected for bioassay had fed for ca. 24-hr (late first-instar) on standard diet.

The bioassay procedure was as follows: A stock suspension of conidia was prepared by placing 40 mg of conidia in 10 ml of sterile distilled water (SDW) containing the wetting agent, Tween-80 (final concentration of 0.5%). Conidia were counted by using phase microscopy and a Bright-line hemacytometer. The stock suspension was then diluted to the desired concentration with SDW, and an 0.1-ml volume of each dilution was spread evenly over the surface of diet that had been previously solidified in disposable, plastic, Petri dishes (diameter, 86 mm; area, 5.8  $\text{cm}^2$ ). We thus provided serial doses ranging from 5 to 3000 conidia/ $\text{mm}^2$ . After the suspensions had dried (10-15 min), 60 first-instar larvae were placed in each dish for 24 hr. Then the larvae were transferred to individual compartments in a

plastic tray (50 compartments/tray) containing semisynthetic diet with the antifungal agents. The trays were then held at  $25^\circ\text{C}$  and ca. 50-60% RH. Mortality was recorded after 24 hr and again after 7 and 10 days. Larval mortality after 10 days was used to obtain an  $\text{LC}_{50}$  and dose-mortality regression equation. Bioassays were replicated six times for both the diet-treatment and leaflet-treatment techniques with ca. 50 larvae/dose per replicate. Bioassays on diet or leaflet for each replicate were done concurrently. The procedure for the leaflet bioassay was identical to that previously described (Ignoffo et al., loc. cit.).

**Results of bioassays.** Results of both bioassays are summarized in Table 1. No mortality was observed when larvae were

fed the diet-treatment procedure can be used to assay for infectivity of conidia of *N. rileyi*. Although the diet-surface bioassay is easier to perform than the leaflet-bioassay and eliminated the requirement for a continuous supply of leaflets, it is less sensitive than the leaflet technique ( $\text{LC}_{50}$  of 135.2 vs. and  $\text{LC}_{50}$  of 12.0 conidia/ $\text{mm}^2$ ). The diet technique therefore is probably more promising as a quality control procedure for routine determination of the infectivity of production batches of conidia or for bioassaying preparations containing relatively high concentrations of conidia rather than as a technique for detecting low levels of infective conidia.

**KEY WORDS:** *Nomuraea rileyi*; entomopathogenic fungus; bioassay technique; conidia infectivity.

We wish to thank Ms. Wanda Pons for her assistance in this study.

C. GARCIA  
C. M. IGNOFFO

0049

Bioassay

F-0049

*Biological Control of Insects Research  
Federal Research  
Science and Education Administration  
U. S. Department of Agriculture  
Columbia, Missouri 65205  
Received April 14, 1978*

Conidia (No./ $\text{mm}^2$ )	Average percentage mortality	
	Leaflet	Diet
0	0.0	0.0
5	42.5 $\pm$ 9.6	4.3 $\pm$ 2.2
10	74.0 $\pm$ 7.8	8.5 $\pm$ 4.8
20	91.3 $\pm$ 2.5	18.8 $\pm$ 4.0
30	98.7 $\pm$ 1.6	28.5 $\pm$ 8.4
100		50.7 $\pm$ 9.9
300		70.6 $\pm$ 10.6
3000		97.6 $\pm$ 2.4

\* Ca. 50 larvae/dose; six replicates/dose.

plastic tray (50 compartments/tray) containing semisynthetic diet with the antifungal agents. The trays were then held at  $25^\circ\text{C}$  and ca. 50-60% RH. Mortality was recorded after 24 hr and again after 7 and 10 days. Larval mortality after 10 days was used to obtain an  $\text{LC}_{50}$  and dose-mortality regression equation. Bioassays were replicated six times for both the diet-treatment and leaflet-treatment techniques with ca. 50 larvae/dose per replicate. Bioassays on diet or leaflet for each replicate were done concurrently. The procedure for the leaflet bioassay was identical to that previously described (Ignoffo et al., loc. cit.).

**Results of bioassays.** Results of both bioassays are summarized in Table 1. No mortality was observed when larvae were

fed the diet-treatment procedure can be used to assay for infectivity of conidia of *N. rileyi*. Although the diet-surface bioassay is easier to perform than the leaflet-bioassay and eliminated the requirement for a continuous supply of leaflets, it is less sensitive than the leaflet technique ( $\text{LC}_{50}$  of 135.2 vs. and  $\text{LC}_{50}$  of 12.0 conidia/ $\text{mm}^2$ ). The diet technique therefore is probably more promising as a quality control procedure for routine determination of the infectivity of production batches of conidia or for bioassaying preparations containing relatively high concentrations of conidia rather than as a technique for detecting low levels of infective conidia.

**KEY WORDS:** *Nomuraea rileyi*; entomopathogenic fungus; bioassay technique; conidia infectivity.

We wish to thank Ms. Wanda Pons for her assistance in this study.

C. GARCIA  
C. M. IGNOFFO

*Biological Control of Insects Research  
Federal Research  
Science and Education Administration  
U. S. Department of Agriculture  
Columbia, Missouri 65205  
Received April 14, 1978*

Biostat

B. Oger et G. Latteur

F-0096

# Description et précision d'une nouvelle méthode d'estimation de la virulence d'une Entomophthorale pathogène de pucerons'

R. OGER<sup>2</sup> et G. LATTEUR<sup>3</sup>

Bureau d'Informatique et de Statistique appliquées, Gembloux<sup>1</sup>  
Station de Zoologie appliquée de l'Etat, Gembloux<sup>2</sup>

## Résumé

Cet article présente une nouvelle méthode de mesure de la virulence des conidies de *Erynia neophidid* REMAUD. et HENN. sur les formes ailées et aptères du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* (HARRIS).

Une analyse probit réalisée sur les résultats de 33 essais à fait ressortir dans chaque cas l'existence d'une régression significative entre le logarithme de la dose et la mortalité des pucerons. Les valeurs des CL<sub>50</sub> qui ont été trouvées oscillent entre 0,32 et 0,94 conidies/mm<sup>2</sup> avec une moyenne de 0,78 pour les pucerons ailés ainsi qu'entre 0,86 et 3,95 avec une moyenne de 1,30 pour les pucerons aptères. La moyenne pondérée des pentes des droites de régression est pratiquement la même pour les pucerons ailés (1,47) que pour les pucerons aptères (1,49). La variance entre essais est plus grande pour les pucerons aptères (0,0234) que pour les pucerons ailés (0,0115) qui, de ce fait, sont plus intéressants à utiliser pour les essais biologiques.

La connaissance de ces paramètres a permis d'étudier l'influence du nombre de répétitions ou d'essais, du nombre de doses et du nombre de pucerons par dose sur la précision des expériences. En pratique, il faut admettre que pour ce type de matériel biologique, il est difficile de mettre en évidence de manière significative des différences entre deux expériences dont le rapport des CL<sub>50</sub> est inférieur à 2.

## Introduction

Depuis que les Entomophthorales sont étudiées dans le but d'être utilisées comme agent biologique de lutte contre les arthropodes nuisibles, différentes méthodes ont été mises en œuvre pour mesurer leur virulence envers leur hôte.

1. Reçu le 14 juillet 1986. Accepté le 6 octobre 1986.
2. Avenue de la Faculté d'Agronomie, 22 - 5800 Gembloux (Belgique).
3. Chemin de Lioux, 8 - 5800 Gembloux (Belgique).

0058



## 1. METHODE D'INOCULATION DES PUCERONS

### 1.1. Production des pucerons et des momies

L'isolat de *Erynia neoaphidis* REMAUD. et HENN. utilisé porte le numéro 47 dans la mycothèque de la Station de Zoologie appliquée. Il a été isolé en Belgique d'un *Sitobion avenae* (F.) en juillet 1979 et maintenu depuis *in vivo* à l'aide du puceron *Acyrtosiphon pisum* (HARRIS).

*A. pisum* est élevé sur plantules de fèves en chambre conditionnée à une température de  $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , une humidité relative de 90% et une intensité lumineuse de 7.000 lux durant 18 heures par jour. Cette population expérimentale provient d'un individu prélevé en octobre 1982 sur luzerne. L'élevage est renouvelé complètement tous les 10 ou 11 jours à l'aide de larves des 1<sup>re</sup> et 2<sup>es</sup> stades sélectionnées par tamisage. De cette façon, les pucerons adultes qui servent aux essais ne sont jamais âgés de plus de 2 ou 3 jours depuis leur dernière mue.

La production des momies qui servent d'inoculum pour les essais est réalisée en infectant des lots d'une cinquantaine de pucerons constitués en majorité de larves du 4<sup>e</sup> stade sélectionnées par tamisage. L'infection est réalisée avec des conidies d'*Erynia neoaphidis* produites par une trentaine de momies placées sur du papier filtre humide d'un diamètre de 25 mm. Lorsque la conidiogénèse se produit, l'ensemble est transféré sur le dispositif d'infection des pucerons (fig. 1.1)

Les pucerons à inoculer sont anesthésiés au CO<sub>2</sub> puis placés, pendant 2 minutes, sous la douche de conidies dans le dispositif décrit à la figure 1.1. Ils sont ensuite transférés sur de jeunes fèves gardées d'abord 24 heures à l'obscurité et 100% d'humidité relative puis sous une photopériode de 18 heures à 18°C et 50% d'humidité relative. Le même inoculum peut servir à infecter de nombreux lots de pucerons. Les momies sont récoltées 4 à 5 jours après l'infection, séchées dans l'air ambiant puis conservées à 5°C et à une humidité relative de 16%.

### 1.2. Inoculation des pucerons et mesure de la virulence des conidies

Les momies utilisées comme source de conidies sont âgées de 15 jours. Trente d'entre elles sont placées sur du papier filtre humide de 25 mm de diamètre et mises à l'obscurité pendant les 15 premières heures de la conidiogénèse puis transférées sur le dispositif d'infection des pucerons (fig. 1.1).

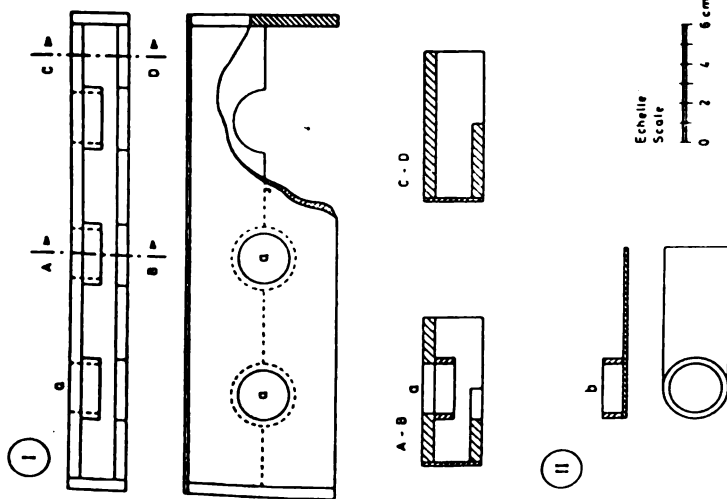
Une analyse critique de ces méthodes a été réalisée par WILDING (1976) dans un article où il décrit une technique qui, pour la première fois, permet d'établir une relation significative entre la dose de conidies reçue par l'insecte et la mortalité, et donc de calculer la concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>). Cette méthode est vraisemblablement la plus précise qui ait été élaborée jusqu'à présent mais elle est très exigeante en temps, surtout pour préparer des insectes, des pucerons dans ce cas, qui sont immobilisés un par un dans de petites boîtes avant d'être exposés aux conidies. Celles-ci atteignent leur maximum en pénétrant par une ouverture d'un mm<sup>2</sup> pratiquée dans une membrane de cellophane qui le recouvre. La dose de conidies émise par unité de surface sur la membrane de part et d'autre de l'ouverture est mesurée à l'aide d'un microscope.

PIEROK et WILDING (1979) ont simplifié la méthode précédente en soumettant les pucerons à un flux de conidies dans un tube de polystyrène cristallin. Les pucerons étant libres, les manipulations sont réduites. Cependant, cette méthode ne permet pas d'estimer la quantité de conidies effectivement reçues par les insectes. Aussi, les auteurs parlent-ils de la concentration de conidies à laquelle sont exposés les pucerons, le nombre de conidies se trouvant au fond du tube étant considéré comme représentatif de celle-ci. Cette méthode a également été utilisée par MILNER et SOPER (1981) ainsi qu' par MILNER et BOURNE (1983) qui y ont toutefois apporté des modifications mineures.

Malgré tous les auteurs précités ont utilisé ces différentes techniques d'infection, il est difficile de comparer la virulence de différentes espèces ou de différentes souches de champignons, soit pour étudier l'influence de certains paramètres sur cette virulence, ils n'ont fourni aucun renseignement sur la précision de leur méthode.

Il nous a donc paru intéressant de nous servir de la méthode qui, tout en étant simple, permet une évaluation satisfaisante des niveaux successifs d'intensité de l'infection des conidies. Les conditions expérimentales ont été standardisées au maximum pour réduire autant que possible les variations entre essais. Nous avons donc réalisé des essais d'infection que nous avons réalisés dans les mêmes conditions avec l'Entomophthorale *Erynia neoaphidis* REMAUD. et HENN. et le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (HARRIS) qui est un hôte nous ont permis d'étudier les relations qui existent entre la prévalence et le nombre de pucerons infectés et le nombre de pucerons par dose, et de trouver des doses dans un même essai et le nombre d'essais.

Il nous a donc paru intéressant de trouver une méthode ainsi que le développement d'une étude relative à sa précision.



1. — Dispositif destiné à inoculer les pucerons.  
Support en plexiglas sur lequel on dépose au-dessus de l'ouverture «a» les momies sources de conidies, disposées sur du papier filtre humide et dirigées vers le bas.  
Cellule dans laquelle sont placés les pucerons à inoculer. «b» est placé en-dessous de «a». Pour les essais de mesure de virulence des conidies une lamelle de verre de 15 x 15 mm est placée dans le fond de «b». Les pucerons sont placés aux 4 coins de la lamelle et les conidies tombées durant l'inoculation sont comptées au microscope sur une surface de 36 mm<sup>2</sup> en balayant à l'aide d'un réticule de 1,2 mm de large les 2 médianes de la lamelle.  
1. Afin d'éviter une dispersion trop importante des conidies dans l'environnement, des dispositifs «b», dépourvus de puceron, sont placés sous «a» entre 2 inoculations.  
2. Pour supprimer les effets éventuels de l'électricité statique sur la trajectoire des conidies, l'intérieur de «b» est recouvert de papier humide.  
*Apparatus to inoculate aphids.*  
*Plexiglas stand on which the mummies producing conidia are placed above the aperture «a» on a wet filter paper and facing downwards.*  
*Cell in which the aphids are placed for inoculation. «b» is placed beneath «a». To measure the virulence of the conidia a 15 x 15 mm cover slip is placed at the bottom of «b». The aphids are arranged at the 4 corners of the cover slip and the conidia that have fallen during inoculation are counted in two central 1,2 mm wide bands extending from N to S and E to W across the cover slip.*  
3. In order to avoid too great a dispersion of conidia in the environment, cells «b» without aphids are placed under «a» between 2 inoculations.  
2. In order to suppress the possible effects of static electricity on the trajectory of the conidia, the inside of «b» is covered with damp paper.

Ceux-ci sont répartis en lots de 10 à 12 pucerons qui sont endormis par traitement au CO<sub>2</sub> pendant une minute puis placés aux quatre coins d'une lamelle de verre de 15 x 15 mm dans le dispositif représenté à la figure 1. Il qui est alors placé en dessous des momies pendant un laps de temps compris généralement entre 1 et 15 secondes. La quantité de conidies tombées en moyenne par mm<sup>2</sup> est mesurée au microscope sur une surface de 36 mm<sup>2</sup> en balayant à l'aide d'un réticule de 1,2 mm de large les 2 médianes de la lamelle. La dose de conidies est déterminée après chaque infection de trois lots de pucerons afin d'ajuster pour les trois lots suivants le temps de projection en fonction des doses requises. 15 ou 20 lots de pucerons sont utilisés pour chaque traitement.

Chaque lot de pucerons infectés est transféré sur des plantules de féveroles puis subissent le même traitement que pour la production des momies.

Les nombres de pucerons vivants, mycosés et morts autrement que par mycose, sont relevés tous les jours du début à la fin de la formation des individus mycosés.

Pour chaque lot, le pourcentage de mortalité par mycose est exprimé par rapport au nombre de pucerons vivants et mycosés le jour de l'apparition de la première mycose.

## 2. PRECISION DE L'ESTIMATION DES CL<sub>50</sub>

La représentation graphique de la proportion d'organismes réagissant de manière positive à différents agents pathogènes, se traduit généralement par une courbe d'allure sigmoïde dont la dissymétrie est plus ou moins prononcée. Celle-ci est généralement réduite en travaillant sur le logarithme de la dose plutôt que sur la dose elle-même.

Comme la pente de cette courbe est maximale pour des taux de réponse proches de 50%, il est logique de comparer différentes préparations en déterminant la dose correspondante; c'est ce qu'on appelle la concentration létale médiane (CL<sub>50</sub>).

L'examen graphique des relations entre le logarithme de la dose et la mortalité, montre que la courbe d'allure sigmoïde peut être transformée en une ligne droite en traduisant les résultats de mortalité dans une échelle probit.

Les caractéristiques des relations qui permettent de calculer les CL<sub>50</sub> peuvent être déterminées par la méthode du maximum de vraisemblance décrite notamment par FINNEY (1952a et 1952b)

La précision de l'estimation d'une  $CL_{50}$  au niveau d'un essai dépend d'un grand nombre de facteurs qui sont liés au mode opératoire proprement dit, à la variabilité inhérente au matériel étudié, au nombre de pucerons soumis à une même dose, au nombre de doses choisies et à la manière dont celles-ci sont réparties par rapport à la dose correspondant au taux de mortalité de 50%.

La variance du logarithme de la  $CL_{50}$  ( $m$ ) est donnée de manière approximative par la relation suivante :

$$s_m^2 = \frac{1}{b^2} \left[ \frac{1}{\sum_i n w_i} + \frac{(m - \bar{x})^2}{\sum_i n w_i (x_i - \bar{x})^2} \right] \quad (1)$$

où :  $b$  est la pente de la droite de régression,  $n$  le nombre de pucerons par dose, les  $w_i$  représentent les facteurs de pondération intervenant dans l'analyse probit, les  $x_i$  sont les logarithmes des différentes doses et  $\bar{x}$  leur moyenne.

Pour les besoins de la pratique, on suppose généralement que les doses sont réparties de manière symétrique par rapport à la  $CL_{50}$ , de sorte que l'expression précédente s'écrit plus simplement :

$$s_m^2 = \frac{1}{b^2} \frac{1}{\sum_i n w_i} \quad (2)$$

Les relations (1) et (2) sont souvent jugées satisfaisantes pour calculer les limites de confiance de  $m$ . Les limites exactes sont données par une expression plus complexe (IRWIN, 1943 et FIELLER, 1944) qui est :

$$m + \frac{g}{1-g} (m - \bar{x}) \pm \frac{t}{b(1-g)} \sqrt{\frac{1-g}{\sum_i n w_i} + \frac{(m - \bar{x})^2}{\sum_i n w_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

et dans laquelle  $t$  représente la variable  $t$  de Student pour un risque d'erreur donné et où  $g$  est égal à  $t^2 / (b^2 \sum_i n w_i (x_i - \bar{x})^2)$ . Pour autant que la valeur de  $g$  soit suffisamment petite, ce qui n'est pas le cas pour les essais qui ont été analysés dans cette étude, les expressions (1) et (2) conduisent sensiblement aux mêmes résultats.

Dans les conditions où la relation (2) constitue une approximation suffisante, il apparaît que la variance de  $m$  est inversement proportionnelle aux trois paramètres  $n$ ,  $b$  et  $\sum_i w_i$ . Les valeurs de  $b$  sont propres au matériel étudié et seront souvent difficiles à modifier sans toucher de manière fondamentale aux conditions expérimentales. La valeur  $\sum_i w_i$  dépend du nombre et de la manière dont les doses sont réparties par rapport à la  $CL_{50}$ . Les valeurs de  $w_i$  seront d'autant plus élevées que les doses observées seront

proches de la  $CL_{50}$ . En pratique, le choix des doses n'est pas toujours aisé à réaliser dans la mesure où l'on ignore l'endroit où se situera la  $CL_{50}$ . A cette difficulté, vient s'ajouter le fait que la dose elle-même (ici, l'intensité des projections) n'est jamais connue avec précision. Dès lors, concentrer au départ tous les points expérimentaux aux alentours de la  $CL_{50}$  présumée, fait courir au chercheur le risque de ne pas inclure la  $CL_{50}$  vraie dans l'intervalle des doses expérimentées. Le terme  $(m - \bar{x})^2$  dans l'expression (1) devient alors non négligeable et la variance  $s_m^2$  peut ainsi se trouver considérablement accrue.

Le nombre de doses ou de pucerons par dose dépendent avant tout du matériel biologique disponible. Le nombre total de pucerons observés peut bien sûr toujours être avantageusement augmenté.

Le choix d'un nombre plus important de doses par rapport au nombre de pucerons par dose peut, d'une certaine façon, réduire le terme  $\sum_i n w_i$  et donc accroître la variance de  $m$ . Cette démarche offre cependant l'avantage de présenter moins de risques de ne pas englober la  $CL_{50}$  et surtout d'augmenter la quantité  $\sum_i n w_i (x_i - \bar{x})^2$  qui intervient dans les expressions (1) et (3).

## 2.2. Entre essais

Indépendamment de ce qui précède, la variance de  $m$  dépend encore de la variance entre essais qui, comme c'est souvent le cas pour ce type d'expérience, s'avère être beaucoup plus importante que la variance à l'intérieur des essais.

L'erreur standard de la moyenne de plusieurs estimations du logarithme de la  $CL_{50}$  déterminée à partir de plusieurs essais est donnée par la relation suivante :

$$s_m = \sqrt{(s_m^2 + s_m^2)/k} \quad (4)$$

où  $s_m^2$  représente la composante de la variance entre essais et  $k$  le nombre d'essais. La valeur de  $s_m^2$  peut être estimée à partir de la variance entre essais (BLISS, 1952).

La connaissance de ces deux composantes de la variance permet de juger de l'influence de différentes conditions expérimentales sur l'estimation de  $s_m$ .

L'analyse a porté sur les résultats de 21 essais sur pucerons ailés et 12 essais sur pucerons aptères réalisés dans les conditions décrites aux paragraphes précédents dans le but d'estimer une  $CL_{50}$ .

L'examen graphique des relations entre le logarithme de l'intensité des projections de conidies et la transformée probit de la mortalité, laisse apparaître dans chaque cas une relation linéaire entre ces deux variables. Le calcul des tests  $\chi^2$  d'hétérogénéité montre que dans tous les essais (tableaux 1 et 2), l'hypothèse d'une relation linéaire est satisfaisante et ne peut être écartée statistiquement au niveau  $\alpha = 0,05$ .

Les pentes de ces droites de régression varient entre 0,74 et 2,03 pour les séries et entre 0,84 et 2,60 pour les pucerons ailés. Un test d'hétérogénéité (FINNEY, 1952a) des différentes valeurs de b dans les 2 séries (tableau 3) permet de montrer que cette variation n'était pas significative et qu'il était alors justifié d'ajuster l'ensemble de ces résultats à l'aide d'une pente commune. Des estimations plus stables des différentes valeurs de m et de l'erreur standard peuvent dès lors être obtenues à partir de ces estimations communes. Les valeurs de g (tableaux 1 et 2) sont assez importantes pour ce type d'essai et elles peuvent dans certains cas atteindre 0,947. L'estimation de la variance de m ne peut se réaliser dans chaque essai à partir de la formule approximative (2) proposée notamment par FINNEY (1952a) mais bien à partir de la relation définissant les limites de confiance (IRWIN, 1943). L'hétérogénéité des différentes régressions n'étant significative dans aucun des essais, il n'a pas été jugé utile de prendre ce facteur en considération dans la suite des calculs.

L'estimation d'une pente commune pour déterminer les différentes valeurs de m a pour conséquence non seulement de réduire et de stabiliser l'écart-type correspondant mais aussi de rendre beaucoup plus petit le terme g qui doit alors être négligé dans les calculs relatifs aux variances et permettre ainsi l'utilisation des formules simplifiées (relations (1) et (2)). Ces nouvelles estimations de m et de son écart-type figurent également dans les tableaux 1 et 2. Les calculs qui seront effectués par la suite se rapporteront toujours à ces valeurs. Les tests d'hétérogénéité qui ont été réalisés (tableau 3) sur ces nouvelles valeurs de m traduisent dans les deux séries des différences significatives entre essais, ce qui suggère la prise en considération de la variance entre essais dans la suite des calculs. La variance totale peut donc être scindée en deux composantes que l'on a noté  $s_m^2$  et  $s_M^2$  dans le chapitre précédent. Lorsque le terme g peut être ignoré, comme c'est le cas ici puisque l'on va travailler à partir de l'estimation commune de b, l'estimation de  $s_M^2$  est

TABLEAU 1  
Analyses probit des essais sur pucerons ailés  
Probit analysis on alate aphids

N° de l'essai	Pente	Ecart-type de la pente	Hétéro-généité	Degrés de liberté	g	log $CL_{50}$ (observé)	Standard log $CL_{50}$ (estimé)	log $CL_{50}$ (estimé)	Standard log $CL_{50}$ (estimé)	Ecart-type de log $CL_{50}$ error	log $CL_{50}$ (observé)	Standard log $CL_{50}$ (estimé)	Ecart-type de log $CL_{50}$ error	log $CL_{50}$ (observé)	Standard log $CL_{50}$ (estimé)	Ecart-type de log $CL_{50}$ error	log $CL_{50}$ (observé)	Standard log $CL_{50}$ (estimé)	Ecart-type de log $CL_{50}$ error
35	2,60	0,435	17,20	18	0,123	-0,472	0,079	0,141	0,094	-0,422	0,094	0,069	0,094	0,38	0,32	0,094	0,069	0,069	0,094
36	1,58	0,535	26,69	18	0,506	-0,472	0,141	0,141	0,069	-0,422	0,069	0,069	0,069	0,32	0,32	0,069	0,069	0,069	0,069
37	1,59	0,295	20,80	18	0,152	-0,317	0,078	0,337	0,069	-0,337	0,069	0,069	0,069	0,46	0,46	0,069	0,069	0,069	0,069
38	0,99	0,279	26,27	18	0,351	-0,121	0,096	0,135	0,064	-0,135	0,064	0,064	0,064	0,73	0,73	0,064	0,064	0,064	0,064
39	1,70	0,486	11,54	13	0,381	-0,071	0,058	0,192	0,077	-0,192	0,077	0,077	0,077	0,64	0,64	0,077	0,077	0,077	0,077
40	2,14	0,583	12,39	13	0,347	-0,158	0,058	0,192	0,077	-0,192	0,077	0,077	0,077	0,87	0,87	0,077	0,077	0,077	0,077
41	2,04	0,390	15,55	18	0,161	-0,285	0,053	0,325	0,069	-0,325	0,069	0,069	0,069	0,47	0,47	0,069	0,069	0,069	0,069
42	1,50	0,350	19,12	18	0,298	-0,298	0,072	0,301	0,065	-0,301	0,065	0,065	0,065	0,50	0,50	0,065	0,065	0,065	0,065
43	1,87	0,348	17,13	18	0,153	-0,118	0,055	0,097	0,067	-0,097	0,067	0,067	0,067	0,80	0,80	0,067	0,067	0,067	0,067
43 bis	1,38	0,230	15,75	18	0,123	-0,366	0,073	0,161	0,067	-0,161	0,067	0,067	0,067	0,44	0,44	0,067	0,067	0,067	0,067
44	1,09	0,297	14,19	12	0,354	-0,154	0,093	0,187	0,064	-0,187	0,064	0,064	0,064	0,65	0,65	0,064	0,064	0,064	0,064
45	1,40	0,389	11,66	18	0,947	-0,120	0,072	0,178	0,064	-0,178	0,064	0,064	0,064	0,66	0,66	0,064	0,064	0,064	0,064
45 bis	1,40	0,344	23,84	18	0,266	-0,113	0,072	0,116	0,066	-0,116	0,066	0,066	0,066	0,77	0,77	0,066	0,066	0,066	0,066
46	1,70	0,330	18,55	12	0,167	0,051	0,066	0,029	0,069	-0,029	0,069	0,069	0,069	0,94	0,94	0,069	0,069	0,069	0,069
47	1,47	0,311	25,48	18	0,198	-0,063	0,069	0,063	0,066	-0,063	0,066	0,066	0,066	0,86	0,86	0,066	0,066	0,066	0,066
48	2,06	0,460	7,58	13	0,233	-0,136	0,056	0,114	0,076	-0,114	0,076	0,076	0,076	0,77	0,77	0,076	0,076	0,076	0,076
49	1,59	0,339	14,66	13	0,212	-0,207	0,078	0,198	0,080	-0,198	0,080	0,080	0,080	0,63	0,63	0,080	0,080	0,080	0,080
49 bis	1,63	0,329	18,05	13	0,190	-0,220	0,071	0,217	0,077	-0,217	0,077	0,077	0,077	0,61	0,61	0,077	0,077	0,077	0,077
51	1,03	0,424	20,91	18	0,749	-0,321	0,095	0,300	0,063	-0,300	0,063	0,063	0,063	0,50	0,50	0,063	0,063	0,063	0,063
52	1,09	0,343	15,17	18	0,437	-0,350	0,084	0,349	0,062	-0,349	0,062	0,062	0,062	0,45	0,45	0,062	0,062	0,062	0,062
53	1,03	0,424	20,91	18	0,749	-0,321	0,095	0,300	0,063	-0,300	0,063	0,063	0,063	0,50	0,50	0,063	0,063	0,063	0,063

simplement la moyenne des variances des différents  $m$  et vaut 0,0049 pour les ailés et 0,0044 pour les aptères. L'estimation de  $s_m^2$  fournit des valeurs de 0,0115 pour les ailés et de 0,0234 pour les aptères. La variance qui a été observée ici est donc 2 fois plus élevée pour les pucerons aptères que pour les ailés. La comparaison de  $s_m^2$  et de  $s_m^2$  montre également que la variance entre essais pouvait être de 3 à 5 fois plus importante que la variance à l'intérieur des essais. Cette constatation n'est guère surprenante et elle avait par exemple déjà été mise en évidence dans les articles de BUCHER et MORSE (1963), de BURGESS et THOMSON (1971) et de HALL (1976). Le nombre d'essais joue donc un rôle déterminant dans l'estimation de la précision des  $CL_{50}$ .

La moyenne  $\bar{m}$  de l'ensemble des essais (tableau 3) a été obtenue en attribuant à chaque estimation de  $m$  un poids  $1/(s_m^2 + s_m^2)$ . Celle-ci est égale à 0,309 pour les aptères et à -0,221 pour les ailés, ce qui correspond respectivement à des projections de 2,04 et 0,60 conidies par  $mm^2$ . Les erreurs standards de  $\bar{m}$  sont de 0,048 et de 0,028.

Connaissant  $s_m^2$  et la pente  $b$  pour un matériel donné, on peut calculer  $s_m^2$  et  $s_m^2$  (relations (2) et (4)) pour différents types de répartition des doses, des nombres variables de doses et de pucerons par dose. Le choix du type de répartition des doses et la détermination des  $w$ , étant toujours fait arbitraire, nous avons préféré, dans la suite du travail, prendre la valeur

TABLEAU 3

Comparaison des caractéristiques de l'ensemble des essais réalisés sur les pucerons aptères et ailés

Comparison of the characteristics of all assays on apterous and alate aphids

Estimation commune de $b$ Weighted mean estimate of $b$	Aptères Apteræ	Ailés Alatae
Estimation de $\bar{m}$ (moyenne pondérée) Weighted mean estimate of $\bar{m}$	1,491	1,468
Erreur standard de $\bar{m}$ Standard error of $\bar{m}$	0,309	-0,221
$CL_{50}$ (Nombre de conidies par $mm^2$ ) $LC_{50}$ (Number of conidia per $mm^2$ )	0,048	0,028
Limites de confiance des $CL_{50}$ ( $\alpha = 0,05$ ) Fiducial limits of the $LC_{50}$ ( $\alpha = 0,05$ )	2,04	0,60
Composantes de la variance Variance Components	1,64-2,53	0,53-0,68
$s_m^2$	0,0044	0,0049
$s_m^2$	0,0234	0,0115

N° de l'essai Nr of the assay	29	30	31	31 bis	32	32 bis	33	33 bis	35	36	37	38	39
Pente Slope (b)	0,98	1,51	2,03	1,42	1,63	1,63	1,89	1,89	1,98	1,91	1,91	1,91	1,91
Ecart-type de la pente Standard error of the slope	0,351	0,306	0,381	0,364	0,433	0,401	0,371	0,354	0,316	0,331	0,316	0,273	0,273
Hétéro-généité Heterogeneity	22,28	14,63	25,01	20,73	16,15	26,10	14,22	19,89	16,38	16,38	17,04	16,33	17,55
Degrés de liberté Degrees of freedom	18	18	18	15	18	18	18	18	18	18	14	18	13
$\epsilon$	0,566	0,181	0,156	0,298	0,311	0,277	0,155	0,155	0,126	0,140	0,126	0,277	0,636
$\log CL_{50}$ (observé) log $LC_{50}$ (observed)	0,256	0,284	0,245	0,358	0,473	0,473	0,045	0,045	0,323	0,228	0,323	0,512	-0,041
Standard de $\log CL_{50}$ Standard error of $\log LC_{50}$	0,102	0,070	0,049	0,066	0,069	0,069	0,079	0,079	0,052	0,050	0,052	0,040	0,203
$\log CL_{50}$ (estimé) log $LC_{50}$ (estimated)	0,298	0,281	0,221	0,357	0,489	0,489	0,357	0,357	0,346	0,289	0,346	0,422	0,145
Standard de $\log CL_{50}$ Standard error of $\log LC_{50}$	0,062	0,065	0,066	0,063	0,064	0,064	0,063	0,063	0,073	0,065	0,066	0,068	0,075
Ecart-type de $\log CL_{50}$ Standard error of $\log LC_{50}$	0,062	0,065	0,066	0,063	0,064	0,064	0,063	0,063	0,073	0,065	0,066	0,068	0,075
$CL_{50}$	1,99	1,91	1,66	2,28	3,08	3,95	3,95	3,95	2,05	1,94	2,22	2,64	1,40

TABLEAU 2  
Analyses probit des essais sur pucerons aptères  
Probit analysis on apterous aphids

venne de  $w$  qui avait été observée à travers tous nos essais (0,50). Pour ces, cela pourrait correspondre à une répartition des mortalités du type: 50% et 85%; pour 5 doses, on aurait 10%, 25%, 50%, 75% et 90%. Les valeurs de  $w$  qui ont été calculées pour différents nombres d'essais, doses et de pucerons par dose et pour une pente égale à 1,476, figurent dans le tableau 4.

Il apparaît clairement que pour un même nombre total d'insectes, c'est le nombre d'essais qui joue le rôle le plus important dans la réduction de leur standard de  $w$ .

Par exemple pour un nombre total de 400 pucerons, c'est la situation avec 5 doses et 10 pucerons par dose qui donne le résultat le plus intéressant (0,061). Si le nombre de pucerons est limité par le matériel disponible, on pourrait être tenté de réduire au maximum le nombre de doses ou pucerons par dose au profit du nombre d'essais. Cette démarche présente cependant plus de risques de s'écarter de la dose qui induit une mortalité de 50%. D'autre part, d'un point de vue pratique, il est beaucoup plus d'augmenter le nombre de doses ou de pucerons par dose que le nombre d'essais pour représenter des erreurs standards d'un logarithme d'une dose, ce qui est une notion difficile à assimiler. HALL (1976) a proposé de limiter le rapport entre la limite supérieure et la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la  $CL_{50}$ . Selon cet auteur, cette grandeur exprimée en unités initiales, traduit mieux l'amplitude de variation

TABEAU 4

Types des estimations des  $log CL_{50}$  pour des nombres variables d'essais ( $k$ ), de doses et de pucerons par dose ( $n$ )  
*Standard errors of estimates of the  $LC_{50}$  for different numbers of assays ( $k$ ), of doses and of aphids per dose ( $n$ )*

	5 doses			10 doses			20 doses		
	$n$	$k$		$k$			$k$		
10	0,086(1)	0,061	0,050	0,102	0,072	0,059	0,127	0,090	0,073
	0,102(2)	0,072	0,059	0,128	0,090	0,074	0,167	0,118	0,097
20	0,072	0,051	0,042	0,090	0,063	0,052	0,117	0,083	0,068
	0,090	0,064	0,052	0,118	0,084	0,068	0,160	0,113	0,093
30	0,066	0,047	0,038	0,085	0,060	0,049	0,114	0,081	0,066
	0,086	0,061	0,050	0,115	0,081	0,066	0,158	0,112	0,091

(1) Pucerons ailés.  
 Alate aphids.  
 (2) Pucerons aptères.  
 Apterous aphids.

des essais et donne d'une manière approchée une idée du moment à partir duquel le rapport de deux  $CL_{50}$  pourra être considéré comme significatif ( $\alpha = 0,05$ ). Les rapports déterminés à partir des écarts-types du tableau 4 sont repris dans le tableau 5. On peut par exemple dire, toujours de manière approximative, que dans une expérience comportant 5 doses et 10 pucerons aptères, répétée dans 12 essais, on doit s'attendre à pouvoir déclarer significativement différentes deux  $CL_{50}$  dont l'une serait au moins 1,7 fois plus grande que l'autre.

Dans ces deux tableaux, on fait toujours l'hypothèse que les mortalités choisies se répartissent de manière symétrique par rapport à 50%. Dans le cas contraire, les valeurs observées de ces rapports devraient être considérablement augmentées.

Comme c'est le nombre d'essais qui est le facteur déterminant pour accroître la précision, nous avons fait figurer dans le tableau suivant (tableau 6) le nombre d'essais qui étaient nécessaires pour atteindre des valeurs fixées des rapports entre les limites supérieures et inférieures des intervalles de confiance des  $CL_{50}$ .

Ainsi, le moyen le plus efficace pour arriver à distinguer statistiquement deux  $CL_{50}$  qui se trouvent au moins dans un rapport de 1 à 2 est, pour les aptères, de choisir 5 doses, 10 pucerons et 8 répétitions, soit un total de 400 pucerons.

TABEAU 5

Rapports entre les limites de confiance ( $\alpha = 0,05$ ) des  $CL_{50}$  pour des nombres variables d'essais ( $k$ ), de doses et de pucerons par dose ( $n$ )  
*Fiducial limit ratios ( $\alpha = 0,05$ ) of the  $LC_{50}$  for different numbers of assays ( $k$ ) doses and of aphids per dose ( $n$ )*

	5 doses			10 doses			20 doses		
	$n$	$k$		$k$			$k$		
10	2,17(1)	1,73	1,57	2,51	1,92	1,70	3,15	2,25	1,93
	2,51(2)	1,92	1,70	3,18	2,25	1,95	4,51	2,90	2,40
20	1,92	1,58	1,46	2,25	1,77	1,60	2,88	2,12	1,85
	2,25	1,78	1,60	2,90	2,13	1,85	4,24	2,77	2,32
30	1,81	1,53	1,41	2,15	1,72	1,56	2,82	2,08	1,81
	2,17	1,73	1,57	2,82	2,08	1,81	4,16	2,75	2,27

(1) Pucerons ailés.  
 Alate aphids.  
 (2) Pucerons aptères.  
 Apterous aphids.

TABLEAU 6  
 Nombre d'essais nécessaires pour atteindre des valeurs fixées de rapports entre les limites supérieures et inférieures des intervalles de confiance des CL<sub>50</sub>  
*Number of assays required to attain selected values of the fiducial limit ratios of the LC<sub>50</sub>*

R	5 doses			10 doses'			20 doses			
	n	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	4	6	8	10	12	15	18	21	24	28
.8	5	7	9	11	13	16	19	22	26	31
.6	6	8	11	14	17	21	25	30	35	41
.4	8	11	15	19	24	30	36	43	51	60
.2	13	18	24	31	39	48	58	69	81	95

nombre de pucerons.

number of aphids

rapport des limites de confiance des CL<sub>50</sub>

fiducial limit ratio of the LC<sub>50</sub>

Pucerons ailés.

Alate aphids.

Pucerons aptères.

Apterous aphids

Ce tableau montre également les limites de l'expérimentation relative à genre de matériel. Vouloir mettre sur pied un essai qui aurait par exemple comme but de mettre en évidence des différences relatives de 40% (R 1,4) nécessiterait un minimum de 1100 pucerons ailés et de 1550 pucerons aptères, ce qui dépasse souvent les disponibilités en temps et en matériel expérimental des laboratoires.

conclusions

Cette analyse a montré que la précision de l'estimation d'une CL<sub>50</sub> à partir d'un essai sur pucerons ailés était du même ordre de grandeur que celle observée sur pucerons aptères. Sur la base de ce critère, nous avons admis que le matériel biologique était comparable. Néanmoins, il est apparu que des différences existaient au niveau de la variation entre essais

et que de ce point de vue, les pucerons ailés étaient certainement les plus intéressants à utiliser pour comparer la virulence de plusieurs souches ou pour étudier l'influence de différents facteurs du milieu.

Cette étude a également permis de vérifier que le facteur principal qui permettait de contrôler la variabilité, et par conséquent la précision, était le nombre d'essais. En pratique, le niveau de variabilité est tel qu'il est difficile d'envisager de mettre en évidence de manière significative des différences entre deux CL<sub>50</sub> qui se trouvaient dans un rapport inférieur à 2.

Compte tenu des remarques qui ont été formulées à propos du choix du nombre d'essais, du nombre de doses et du volume du matériel (nombre de pucerons) à mettre en œuvre lors de chaque essai, il semble qu'une expérience comportant 3 à 4 répétitions (essais) où l'on observe 10 pucerons ailés pour 10 à 20 niveaux différents de projection de conidies constitue un compromis acceptable.

Summary

DESCRIPTION AND PRECISION OF A NEW METHOD FOR ESTIMATING THE INFECTIVITY OF AN APHID ENTOMOPHITHORALE

A new method for estimating the infectivity of *Erynia neophidius* REMAUD. and HENN. for alate and apterous pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* (HARRIS), is described.

Maximum likelihood probit analysis on 33 assays indicate significant regressions between the logarithm of the dose and the probit mortality for all assays. LC<sub>50</sub> values range from 0.32 to 0.94 conidia/mm<sup>2</sup> with a weighted mean of 0.78 for alate aphids and from 0.86 to 1.95 conidia/mm<sup>2</sup> with a weighted mean of 1.30 for apterous aphids. In both cases the weighted mean slopes were very similar (1.47 for alate and 1.49 for apterous aphids). The between assay variance is greater for apterae (0.0234) than for alatae (0.0115) which are therefore more interesting to use in bio-assays.

The knowledge of these parameters has permitted a study of the influence of the number of replicates or trials, of the number of doses and of the number of aphids per dose on the precision of the experiments. In practice it will be difficult with this technique to detect significant differences between two assays for which the ratio of the LC<sub>50</sub> is inferior to 2.

Références bibliographiques

BUSS, C.I., 1952. *The statistics of Bioassay*. Academic Press, New York : 183 p.  
 BUCHER, G.E. & MORSE, P.M., 1963. Precision of Estimates of the Median Lethal Dose of Insect Pathogens. *Journal of Insect Pathology* 5 : 289-308.  
 BURGESS, H.D. & THOMSON, E.M., 1971. Standardization and assay of microbial insecticides. In: *Microbial Control of Insects and Mites*. (BURGES, H.D. and HUSSEY, N.W. eds) : 591-622. Academic Press, New York.

# Influence de divers facteurs physiques sur la virulence des conidies de l'Entomophthorale *Erynia neoaphidis* REMAUD. et HENN. envers le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (HARRIS) <sup>1</sup>

G. LATTEUR<sup>2</sup>, E. LIZEN<sup>2</sup> et R. OGER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Station de Zoologie appliquée de l'Etat, Gembloux<sup>2</sup>  
Bureau d'Informatique et de Statistique appliquées, Gembloux

## Sommaire

La virulence des conidies produites par des momies de pucerons mycosés par *Erynia neoaphidis* REMAUD. et HENN. est identique, que les momies aient 1 jour ou qu'elles soient conservées depuis 15 jours ou 6 mois à 5°C et 16% d'humidité relative. Les conidies émises entre la 1<sup>re</sup> et la 3<sup>e</sup> heure de la conidiogénèse sont plus virulentes que celles produites entre la 15<sup>e</sup> et la 17<sup>e</sup> heure. Pendant la conidiogénèse, la lumière a un effet nettement favorable sur le pouvoir pathogène des conidies.

Le taux de pucerons mycosés est plus élevé lorsque les insectes sont placés à l'obscurité plutôt qu'à la lumière pendant les 24 premières heures qui suivent leur inoculation. Au cours de cette période, des trois températures (14°C, 18°C et 22°C) auxquelles ont été soumis les pucerons, c'est à 18°C que le taux de mycose est le plus élevé.

Un stockage de 24 heures à 100% d'humidité relative et à l'obscurité, après l'inoculation des pucerons, semble suffisant pour assurer un taux de mycose maximum d'autant que, dans 3 essais sur 4, un séjour de 12 heures à l'humidité saturante procure déjà un résultat maximum.

## Introduction

Dans une précédente publication (OGER et LATTEUR, 1985), une nouvelle méthode destinée à mesurer les concentrations léthales 50 (CL<sub>50</sub>) des conidies d'Entomophthorales envers les pucerons a été décrite et analysée statistiquement.

1. Reçu le 14 juillet 1986. Accepté le 6 octobre 1986.
2. Chemin de Liroux, 8 - 5800 Gembloux (Belgique).
3. Avenue de la Faculté d'Agronomie, 22 - 5800 Gembloux (Belgique).

COHEN, E.C., 1944. A fundamental formula in the statistics of biological assay and some applications. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 17: 117-123.

NEY, D.J., 1952a. *Probabil Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge England: 318 p.

NEY, D.J., 1952b. *Statistical Method in Biological Assays*. Griffin, London: 661 p.

LITTLE, R.A., 1976. A Bioassay of the Pathogenicity of *Verticillium Lecanii* Conidiospores on the Aphid, *Macrosiphonia sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 27: 41-48.

WIN, J.O., 1943. On the calculation of the error of biological assays. *Journal of Hygiene*, 43: 121-128.

NER, R.J. & SOPER, R.S., 1981. Bioassay of *Entomophthora* against the spotted Alfalfa Aphid *Therioaphis trifolii* f. *maculata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37: 168-173.

NER, R.J. & BOURNE, J., 1983. Influence of temperature and duration of leaf wetness on infection of *Acyrtosiphon Kondoi* with *Erynia neoaphidis*. *Ann. appl. Biol.*, 102: 19-27.

EROK, B. & WILDING, N., 1979. Mise en évidence d'une différence de sensibilité entre 2 souches du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* HARR (Homoptères, Aphididae), exposés à deux souches du champignon Phycomycète: *Entomophthora obscura* HALL et DUN. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 288, série D: 93-95.

ING, N., 1976. Determination of the infectivity of *Entomophthora* spp. *Proc. of 1st. Int. Coll. Invertebr. Pathology*. Kingston, Canada: 296-300.



- 15102
- 2110 - 17
- HO, V. C., KAN, S. P., CHAN, K. L., SHU, A. & LIKOU, E. J. — 1974. *Exovis* (*Phylloporus*) at the puparian endoparasitism of puparia of synanthropic flies (*Hymenoptera*: *Encyrtidae*). *J. Histobiol. studies of its life cycle*. — *Can. Entomol.*, 106, 201-208.
- HAWLITZKY, N. & MANGUET, A. M. — 1976. Analyse quantitative des lipides, des substances azotées et du glycogène chez la larve d'un insecte parasite ovo-larvaire *Phanerotomus flaviventris* (*Hymenoptera*, *Brachnidae*). — *Entomol. Exp. Appl.*, 20, 43-55.
- KITANO, H. — 1974. Effects of the parasitization of a braconid *Apanteles* on the blood of its host. *Pieris*. — *J. Insect Physiol.*, 20, 315-327.
- LE BERRE, J. R. & STAVRAKIS, C. — 1966. Étude physiologique du développement d'un diptère *Ephyrididae Hydrilla griseola* FALL. : évolution biochimique chez la larve et la pupa. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 263, 136-139.
- LENARTOWICZ, E., ZALUSKA, H. & NIEMIERKO, S. — 1967. Carbohydrates in the wax moth during development. — *Acta Biochim. Pol.*, 14, 267-275.
- LOCKE, M. & COLLINS, J. V. — 1968. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. — *J. Cell Biol.*, 36, 453-483.
- MARTOJA, R. & LAUVERJAT, S. — 1964. Caractères histochemiques et dimorphisme sexuel du corps gras chez les insectes Orthoptères. — *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 89, 339-383.
- NIEMIERKO, S., WLODAWER, P. & WOJTCZAK, A. F. — 1956. Lipid and phosphorus metabolism during growth of the silk worm (*Bombyx mori* L.). — *Acta Biol. Exp.*, 17, 255-276.
- PANT, R. & MOHARIS, D. — 1972. Variation in glycogen, total free sugars, protein alkaline and acid phosphatases, citrate and inorganic phosphorus level in fat body of *Philosamia ricinia* (Eri-Silkworm) during development. — *J. Biochem.*, 71, 1-8.
- RUDOLFS, W. — 1929. Studies on chemical changes during the life cycle of the tent caterpillar (*Melicospoma americana* FAB.). IV. Glycogen. — *J. N. Y. Entomol. Soc.*, 37, 17-23.
- SCOGGIN, J. K. & TAUBER, O. E. — 1950. Survey of literature on insect lipids. — *Iowa State Coll. J. Sci.*, 25, 99-124.

at. 102: 2110 en France (Puffinberger)  
 106 Biochimie (Léon)

UTILISATION DES LARVES DE *PLUTELLA MACULIPENNIS*  
 [LEP. : *HYPONOMEUTIDAE*]  
 COMME INSECTE-TEST  
 DE DIVERS HYPHOMYCÈTES ENTOMOPATHOGÈNES  
 (*FUNGI IMPERFECTI*)

P. ROBERT & M. MARCHAL

I. N. R. A., Station de Recherches de Lutte biologique,  
 La Minière, 78280 Guyancourt, France

La sensibilité de *Plutella maculipennis* CURT. à divers hyphomycètes entomopathogènes est définie par des essais biologiques en conditions standardisées. La contamination est réalisée par pulvérisation sous tour de traitement de rondelles de chou calibrées : les chenilles au 3<sup>e</sup> stade, venant de muer, sont placées pendant 48 h sur les rondelles traitées.

Le calcul des droites logarithme de la dose-probit de la mortalité et des DL 50 le 6<sup>e</sup> j après le traitement, montre que les larves de *P. maculipennis* sont sensibles aux différents types de propagules fongiques quelle que soit la formulation : conidiospores, blastospores non formulées, lyophilisées ou entrobées dans l'argile.

La pathogénie de diverses souches de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL., *B. brongniartii* (SACC.) PETCH., *Nomuraea rileyi* (FARL.) SANS., *Metarhizium anisopliae* (METCH.) SOR., *M. flavoviride* GAMS. & ROZYPAL, et *Puccilomyces fumosoroseus* WIZE (BROWN & SMITH) est étudiée. Les résultats montrent dans quelles conditions *P. maculipennis* est utilisé à La Minière comme insecte-test pour vérifier la qualité des préparations à base d'hyphomycètes.

La standardisation des préparations à base de microorganismes entomopathogènes nécessite des contrôles de la qualité des germes aux diverses étapes de la production : multiplication, formulation et conservation (BURGERION & DULMAGE, 1977; DULMAGE & BURGERION, 1977). Dans le cas des champignons hyphomycètes, les critères de qualité retenus sont la viabilité et le pouvoir pathogène des spores (MÜLLER-KÖGLER, 1967). Une préparation peut maintenir son potentiel d'inoculum intact tout en présentant une altération de son potentiel infectieux, soit au cours de la formulation (BELOVA *et al.*, 1974) soit pendant la conservation (FARGUES *et al.*, 1979). C'est pourquoi divers auteurs se sont attachés à mettre au point des contrôles biologiques sur des insectes dont l'élevage pouvait être standardisé, comme *Musca domestica* L. (*Dip.* : *Muscidae*) (SHASIRAJ *et al.*, 1974); *Drosophila* sp. (*Dip.* : *Drosophilidae*) (KIRSANOVA *et al.*, 1975); *Acanthoscelides obtectus* SAY (*Col.* : *Bruchidae*) (FERRON & ROBERT, 1975).

Il nous a semblé utile de diversifier la gamme d'hôtes de remplacement en introduisant un lépidoptère dans les essais biologiques avec des champignons imparfaits. Nous avons retenu la teigne des crucifères, *Plutella maculipennis* CURT. (*Lep. Hyponomeutidae*), car

insecte à un cycle court et son élevage en laboratoire est aisé. Il a déjà été employé dans un insecte-test pour des recherches sur *Bacillus thuringiensis* BERLINER (DUBOIS & ARTOLRET, 1976).

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les essais ont été réalisés avec des chenilles de *P. maculipennis* et différentes souches de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUIL., *B. brongniartii* (SACC.) PETCH. (= *B. tenella* (DELACR.) SOR.), *Nomuraea rileyi* (FARL.) SANS., *Metarhizium anisopliae* (METCH.) SOR., *M. flavoviride* (GAMS & ROZSPAL) et *Purcellomyces fumoso-roseus* (WIZE) BROWN & SMITH, isolées à partir de cadavres des espèces hôtes mentionnées dans le tableau I.

TABLEAU I

Pathotypes cryptogamiques utilisés dans les essais biologiques  
(Mycothèque de la Station de Lutte Biologique, I.N.R.A. La Minière)

Champignon	Isolat n°	Insecte hôte d'origine
<i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUIL.	18	<i>Epinotia reticulata</i> (DIARI) / Lep. : Tortricidae
	93	<i>Lepidotarsus decemlineatus</i> (SAY) / Col. : Chrysomelidae
<i>Beauveria brongniartii</i> (SACC.) PETCH.	13	<i>Costeleyra zealandica</i> (WHITE) / Col. : Melolonthidae
	47	<i>Melolontha melolontha</i> L. / Col. : Melolonthidae
<i>Nomuraea rileyi</i> (FARL.) SANS.	5	<i>Anticarsia gemmatilis</i> (HB.) / Lep. : Noctuidae
	32	<i>Crotalaria aurata</i> L. / Col. : Crotalidae
<i>Metarhizium anisopliae</i> (METCH.) SOR. var. <i>anisopliae</i> (*)	44	<i>Lepidotarsus decemlineatus</i> (SAY) / Col. : Chrysomelidae
	71	<i>L. decemlineatus</i> (SAY) / Col. : Chrysomelidae
<i>Metarhizium anisopliae</i> (METCH.) SOR. var. <i>major</i> (*)	120	Moustique (U.S.A.)
<i>Metarhizium anisopliae</i> (METCH.) SOR. var. <i>anisopliae</i> (*)	51	<i>Oryctes rhinoceros</i> L. / Col. : Dynastidae
	88	<i>Otarthymachus sulcatus</i> F. / Col. : Curculionidae
<i>Purcellomyces fumoso-roseus</i> (WIZE) BROWN & SMITH	39	<i>L. decemlineatus</i> (SAY) / Col. : Chrysomelidae

(\*) Selon la classification de TELLOCH (1976).

L'élevage de la teigne des crucifères a été conduit à 18°C, sous une photopériode de 16 h (DEVRIENT & MARTOURET, 1976). Le protocole des essais est du type blocs complets, à raison de 4 blocs. Chaque variante expérimentale comprend ainsi la contamination de 4 rondelles de feuille de chou sur chacune desquelles est alimenté pendant 48 h un lot de 20 chenilles.

Le traitement consiste à pulvériser l'inoculum cryptogamique, sur les 4 rondelles (calibrées à 50 mm de diamètre), sous la tour décrite par BURGERON (1956). L'opération est menée 2 fois : sur la face supérieure puis, après séchage sur la face inférieure des rondelles. Chaque face reçoit un dépôt homogène de 4 µg/cm<sup>2</sup>. Aux 4 doses retenues : 1.10<sup>4</sup>, 1.10<sup>5</sup>, 1.10<sup>6</sup> et 1.10<sup>7</sup> spores/ml, correspondent respectivement des dépôts de 4.10<sup>3</sup>, 4.10<sup>4</sup>, 4.10<sup>5</sup> et 4.10<sup>6</sup> spores/cm<sup>2</sup>. Chaque rondelle de feuille est ensuite placée sur du papier filtre

humidifié dans une boîte cylindrique fermée en polystyrène transparent. L'essai a été conduit dans les mêmes conditions que l'élevage de production (18°C et 16 h de photopériode).

Après 48 h de contact avec le feuillage traité, les chenilles sont transférées dans des boîtes propres, sur du feuillage sain. Par la suite, les contrôles sont effectués tous les 2-3 jours afin de renouveler l'aliment, changer le papier filtre et placer les chenilles mortes en chambre froide.

Pour l'interprétation des résultats, 2 méthodes d'analyses sont utilisées : soit la transformation de mortalité probit — logarithme de la dose aboutissant au tracé de la droite de HENRY, soit la transformation angulaire des pourcentages de mortalité qui permet de recourir à l'analyse de variance et aux tests de comparaison des moyennes de DUNCAN (SNEDECOR & COCHRAN, 1971) (1).

## RÉSULTATS

La durée de l'incubation de la maladie dépend de la dose de spores utilisée, les premiers cas de mortalité apparaissant dès le 3<sup>e</sup> ou le 4<sup>e</sup> jour qui suit l'application : le 6<sup>e</sup> jour après le traitement, il a été possible d'analyser la relation entre la dose d'inoculum cryptogamique et la mortalité cumulée (fig. 1) : avec des conidiospores récoltées après culture en surface de *B. brongniartii* n° 47 (Y1), des blastospores de *B. bassiana* n° 18 obtenues en fermenteur, et la mortalité cumulée (Y2), soit lyophilisées (Y3), soit enrobées dans de l'argile (Y4) (FARGUES *et al.*, 1979). Quel que soit le type de propagules, la relation dose-mortalité est linéaire (fig. 1) : la légitimité de la linéarité de chacune des régressions a été éprouvée par un test de  $\chi^2$ . Les équations des droites logarithmiques sont respectivement :  $Y_1 = 2.2 \times 10^7$  spores/ml (Y1),  $2.3 \times 10^7$  spores/ml (Y2),  $7.5 \times 10^6$  spores/ml (Y3) et  $1.5 \times 10^7$  spores/ml (Y4).

Le compte tenu de la durée d'incubation limitée à 6 j, la fidélité de la réponse à l'infection des larves de *P. maculipennis* est comparable à celle des adultes de *A. obiectus* (DL 50 de 3,7 x 10<sup>7</sup> conidiospores de *B. bassiana*/ml après 2 semaines (FERRON & ROBERT, 1975) ou celle des adultes de *M. domestica* : DL 50 de 1 x 10<sup>6</sup> conidiospores/ml au bout de 8 j (RAZANANAIVO, 1977).

La réceptivité des larves de *P. maculipennis* à 12 souches d'hyphomycètes entomopathogènes (tableau I) cultivées sur milieu semi-synthétique gélosé (PARIS, 1973) a été étudiée par pulvérisation d'un inoculum tiré à 1 x 10<sup>8</sup> conidiospores/ml (dépôt de 4 x 10<sup>5</sup> spores/cm<sup>2</sup>) avec 4 répétitions par pathotype. D'après l'analyse des résultats (tableau 2), au 6<sup>e</sup> j les taux de mortalité des lots traités par *B. bassiana* n° 18 et 93, *B. brongniartii* n° 13 et 47, ainsi que par *M. anisopliae* n° 32 et 71, et *P. fumoso-roseus* n° 39. Après 10 j d'incubation, la mortalité cumulée provoquée par *B. bassiana* n° 93 et *B. brongniartii* n° 13 et 47 n'est pas significativement modifiée.

Les souches de *N. rileyi* n° 5, *M. anisopliae* n° 44, 51 et 120 ainsi que *M. flavoviride* n° 88 ne sont pas pathogènes pour les larves de *P. maculipennis* (effets non significatifs par rapport aux lots témoins).

(1) Nous remercions R. GOUJET pour la programmation des tests d'analyse statistique.

TABLEAU 2

Sensibilité des larves L<sub>3</sub> de *Plutella maculipennis* à 12 souches d'hyménozytes entomopathogènes

Variante expérimentale	Mortalité larvaire cumulée (%) (a)						Différence entre le 6 <sup>e</sup> et le 10 <sup>e</sup> jour (c)	
	6 j		10 j		Moyenne	Différence par rapport aux lots témoins (c)		
	Moyenne	Différence par rapport aux lots témoins (c)	Moyenne	Différence par rapport aux lots témoins (c)				
moins	7,18		12,30					
<i>arrivaria hawaiiensis</i>	18	91,28	84,1	H.S.	99,99	87,69	H.S.	5,12
<i>hawaiiensis</i>	93	65,39	58,21	H.S.	90,08	77,78	H.S.	8,71
<i>brongniartii</i>	13	75,73	68,55	H.S.	96,40	84,10	H.S.	24,69
"	47	58,88	51,7	H.S.	99,99	87,69	H.S.	20,67
<i>maruae rileyi</i>	5	0	0		8,96			41,11
<i>tarltonii unisopliae</i>	32	99,99	92,81	H.S.	99,99	82,81	N.S.	0
"	44	19,30	12,12	N.S.	26,27	13,97	N.S.	6,97
"	51	13,51	6,33	N.S.	34,73	12,43	N.S.	11,22
"	71	74,06	66,88	H.S.	86,54	74,24	H.S.	12,48
"	120	13,51	6,33	N.S.	18,63	6,33	N.S.	5,12
<i>flavoviride</i>	88	0	0		12,90	0,60	N.S.	
<i>funosporuseta</i>	59	51,28	46,1	H.S.	64,75	52,45	H.S.	11,47

(a) Mortalité larvaire cumulée 6 et 10 j après la contamination par pulvérisation d'un inoculum de 1.10<sup>8</sup> conidiospores/ml. soit 4.10<sup>7</sup> spores/cm<sup>2</sup>.  
 (b) Données transformées en valeur angulaire soumise à l'analyse de variance.  
 (c) Comparaison des moyennes par le test de Duncan. Signification des mortalités provoquées par les différents types par rapport aux témoins, et signification des mortalités après 6 j et après 10 j pour chaque variante expérimentale: H.S. = différence hautement significative (1%), S. = différence significative (5%), N.S. = différence non significative.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La résistance des larves de *P. maculipennis* à *M. rileyi* n° 5, pathogène pour les chenilles de *Spodoptera littoralis* BOISD. (FARGUES & RODRIGUEZ, 1974), aux souches de *f. anisopliae* n° 44 et 51, actives sur les larves de *Lepidoptera decemlineata* SAY et de *ryctes rhinoceros* L. (FARGUES, 1976; FARGUES *et al.*, 1976), et à *M. flavoviride* n° 88 pathogène pour *Otiorynchus sulcatus* F. (MARCHAL, 1977) montre que subsiste un problème de spécificité quel que soit l'insecte test adopté (FARGUES & REMAUDIÈRE, 1977; AZANANAIVO, 1977; FERRON, 1978).

Le délai suffisant pour éprouver la qualité d'une préparation, lorsque la souche considérée est pathogène pour l'insecte est seulement de 6 j avec les larves de *P. maculipennis*, alors qu'il est de 10 à 15 j avec les adultes de *M. domesitica* (RAZANANAIVO, 1977) ou de *A. obrectus* (FERRON & ROBERT, 1975). De plus, la mortalité dans les lots témoins sans le cas de la chenille des crucifères est très faible (2,5 % en moyenne au bout de 6 j, avec un maximum de 5 %) comme chez la bruche du haricot, alors que chez les mouches elle est d'environ 30 % (16 à 40 %) et vraisemblablement imputable à l'utilisation du gaz carbonique comme anesthésique au cours des essais biologiques (RAZANANAIVO, 1977).

Enfin, les chenilles de *P. maculipennis* sont sensibles aux propagules fongiques quel que soit leur type ou leur formulation, alors que les adultes de *A. obrectus* (très réceptif aux conidiospores non formulées, FERRON & ROBERT, 1975), ne sont pas sensibles aux différentes formulations.

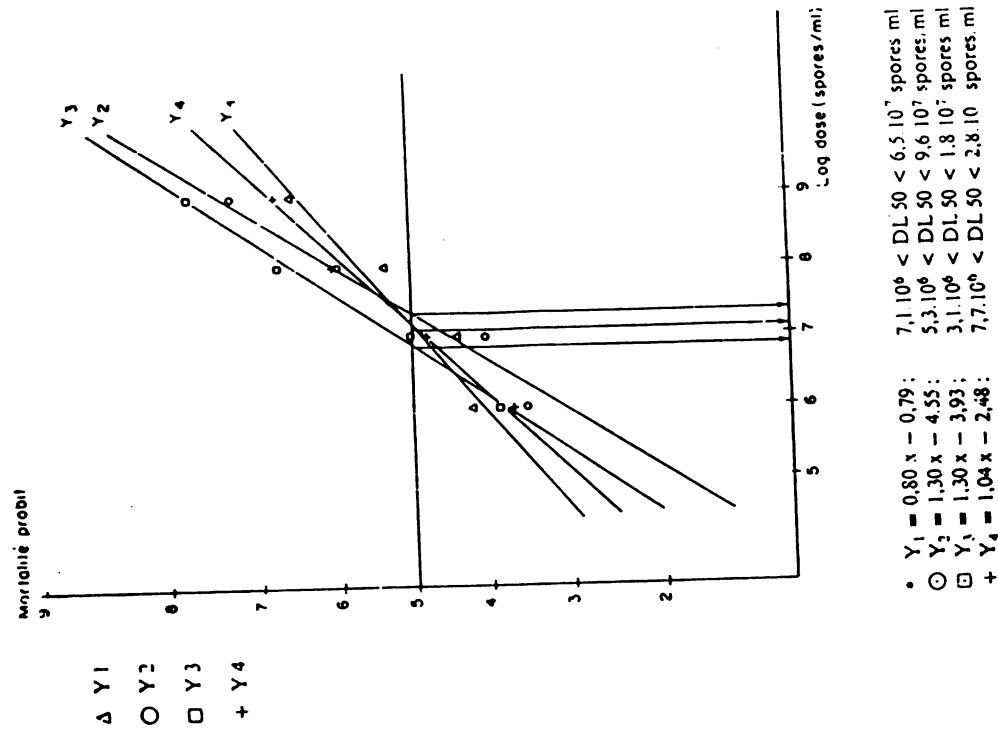


Fig. 1. Droites log-dose-probit de la mortalité étiolées 6 j après le traitement des larves (L3) de *P. maculipennis* avec des conidiospores de *B. brongniartii* n° 47 (Y1) et différents types de propagules de *B. hawaiiensis* n° 18 : blastospores non formulés (Y2), blastospores lyophilisés (Y3) et blastospores enrobés dans l'argile (Y4).

La durée réduite des essais biologiques, la sensibilité aux spores après formulation, jointes aux facilités d'élevage, nous a permis de retenir *P. maculipennis* en tant qu'insecte test pour éprouver la qualité de certaines biopréparations cryptogamiques.

Use of *Plutella maculipennis* larvae as insect-tests for entomopathogenic hyphomycetes  
[Fungi Imperfecti]

bioassays of entomopathogenic hyphomycetes were conducted with 3rd instar larvae of *Plutella maculipennis* C.v.r. at controlled conditions. Contaminations were carried out by spraying fungi on small cabbage foliage discs in a spray tower.

Recently molted larvae were placed on contaminated discs during 48 h. The LD 50 dosages showed susceptibility of insects to different *Beauveria* propagules such as conidiospores, not formulated spores, lyophilized blastospores or clay-coated blastospores.

Moreover some strains of *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL., *B. brongniartii* (SACC.) PETCH *varietatis* (FARL.) SAKS., *Metarhizium anisopliae* (METC.) SOR., *M. flavoviride* GANES & RIZOV, and *Pteridomyces lunosoroensis* (WIZE) BROWN & SMITH were tested for specificity to *P. maculipennis* larvae. The results indicated that Lepidoptera larvae are interesting as test insects to measure the efficacy of some hyphomycetes biopreparations. It was established that a 6 days delay after treatment is sufficient when the fungal strain is pathogenic to *P. maculipennis*.

BIBLIOGRAPHIE

- BARA, R. N., SHURKINA, L. A., SHARAJ, L. G., ZHUKOV, V. N. & KUZHEVA, L. M. — 1974. Etude du processus de séchage de la Beauverine. In : Méthode biologique dans la protection des plantes. — *Lenina Akad. Vses Nauk. Inst. Biol. Zash. Kishinev*, 15-16 (en russe).
- BERNARD, A. — 1956. Pulvérisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes fongicides. — *Ann. Epiphyt.*, 4, 677-686.
- BERNARD, A. & DULMAGE, H. — 1977. Industrial and international standardization of microbial pesticides. I. *Bacillus thuringiensis*. — *Entomophaga*, 22, 121-129.
- ENDT, M. & MARTOURET, D. — 1976. Absence de résistance à *Bacillus thuringiensis* chez la teigne crucifère *Plutella maculipennis* [Lep. : Hyponomeutidae]. — *Entomophaga*, 21, 189-199.
- FACE, H. & BURGERSON, A. — 1977. Industrial and international standardization of microbial pesticides. II. Insect viruses. — *Entomophaga*, 22, 131-139.
- FAVRE, J. — 1976. Spécificité des champignons pathogènes imparfaits (Hyphomycètes) pour les larves de coléoptères [Scarabaeidae et Chrysomelidae]. — *Entomophaga*, 21, 313-323.
- FAVRE, J. & RODRIGUEZ, D. — 1974. Etude préliminaire sur la pathogénicité pour les noctuelles des champignons imparfaits (Deutéromycètes) entomopathogènes. — *Rev. Zool. Agric. Pathol. Vég.*, 1, 25-34.
- FAVRE, J., ROBERT, P. H. & VEY, A. — 1976. Rôle du tégument et de la défense cellulaire des coléoptères hôtes dans la spécificité des souches entomopathogènes de *Metarhizium anisopliae* [Fungi Imperfecti]. — *C. R. Acad. Sc. Paris*, D, 282, 2223-2226.
- FAVRE, J. & REMAUDIÈRE, G. — 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. — *Mycopathologia*, 62, 31-37.
- FAVRE, J., ROBERT, P. H. & REISINGER, O. — 1979. Formulation des productions de masse de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires. — *Ann. Zool. Écol. Anim.*, 11.
- FELDMAN, P. — 1978. Étiologie et épidémiologie des muscardines. — *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Univ. Paris VI, 114 pp.
- FELDMAN, P. & ROBERT, P. H. — 1975. Virulence of entomopathogenic fungi [Fungi Imperfecti] for the adults of *Acanthoscelides obierius* [Coleoptera Bruchidae]. — *J. Invertebr. Pathol.*, 25, 379-388.
- FRANOVA, R. V., LEVITIN, M. M., LEKARKINA, L. P., USENKO, L. I. & SHARYGIN, V. I. — 1975. *Drosophila* entomopathogenous fungus *Beauveria bassiana* as a model for studying the interrelations between host and parasite. — *Zhuch. Obschch. Biol.*, 36, 251-58 (en russe).
- FURUKAWA, M. — 1977. Fungi imperfecti isolés d'une population naturelle d'*Otiorrhynchus sulcatus* I. [Col. Curculionidae]. — *Rev. Zool. Agric. Pathol. Vég.*, 76, 101-108.

MÜLLER-KINGLICK, E. — 1967. On mass cultivation, determination of effectiveness, and standardization of insect pathogenic fungi. — *Proc. Insect Pathol. Microb. Control. Int. Colling Wageningen*, 1966, 349-353.

PARIS, S. — 1973. Étude physiologique et biochimique de *Beauveria tenella* (DELAECR.) SIEGL. champignon pathogène pour la larve du Hanneton commun *Melolontha melolontha* L. — *Thèse 3<sup>e</sup> cycle. Biol. Cell. Paris Sud*, 42 pp.

SAZANANAIYO, L. — 1977. Contribution à la mise au point du titrage biologique des champignons entomopathogènes ; exemple de la mycose à *Beauveria brongniartii* (Fungi imperfecti, Moniliales). — *Thèse 3<sup>e</sup> cycle. Entomol., Paris Sud*, 97 pp.

SHARAJ, L. G., SINITSYNA, L. P. & VAUBLEVSKAYA, L. S. — 1974. A biological method of estimating Beauverin activity. In : Biological Methods for Plant Protection. — *Inst. Biol. Mei. Zash. Rus. Kishinev*, 10-12 (en russe).

SHARAJ, L. G. & COCHRAN, W. G. — 1971. Méthodes Statistiques — A.C.T.A., Paris, 619 pp.

SNEDCOR, G. W. & COCHRAN, W. G. — 1976. The genus *Metarhizium*. — *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66, 407-411.

TULLOCH, M. — 1976. The genus *Metarhizium*. — *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66, 407-411.

# MICROBIAL PATHOGENS

P. C. SUNDARA BABU

Tamil Nadu Agricultural University Coimbatore 641 013

2210-12

The count of microbial pathogen gives a measure of potency of microbial preparation. In all counts, suspend the organisms in buffer, separate them from one another and dilute to suitable level. A known volume of the suspension is examined microscopically for a particle count or applied to a nutrient medium for a count of viable organisms. A number of counts are averaged. Simple statistics is used to obtain precision of the estimate.

## STEPS INVOLVED IN STANDARDIZATION

1. Preparation of a dilute homogeneous suspension,
2. Counts of particles : a) Counting chambers, b) Counts of particles in agar films, c) Counts of particles in stained films, d) Electronic counts, and e) Counts under electron microscope
3. Counts of viable organisms : a) Preparation of suspension and b) Plating - pour plate method.

COUNTING CHAMBER : Haemocytometer is used for counting spores of bacteria, fungi and PIB of viruses.

## STEPS :

FUNGAL SPORES : 1. Culture the fungus in suitable medium, 2. A quantity of 100 ml of sterile water is taken in 250 ml conical flask, 3. Add 20 ml of sterile water to culture and shake well, 4. Add the spore suspension to flask. Repeat 3 or 4 times, 5. To the spore suspension add two drops of Tween 80. Shake well, 6. Keep the flask in a mechanical agitator, 7. A thin film of suspension added to Haemocytometer, cover slip put and spores counted in low power of the microscope and 8. Mean of many counts taken.

## MICROBIAL PATHOGENS

P. C. SUNDARA BABU

Tamil Nadu Agricultural University Coimbatore 641 011

2510-12

The count of microbial pathogen gives a measure of potency of microbial preparation. In all counts, suspend the organisms in buffer, separate them from one another and dilute to suitable level. A known volume of the suspension is examined microscopically for a particle count or applied to a nutrient medium for a count of viable organisms. A number of counts are averaged. Simple statistics is used to obtain precision of the estimate.

## STEPS INVOLVED IN STANDARDIZATION

1. Preparation of a dilute homogeneous suspension,
2. Counts of particles : a) Counting chambers, b) Counts of particles in agar films, c) Counts of particles in stained films, d) Electronic counts, and e) Counts under electron microscope
3. Counts of viable organisms : a) Preparation of suspension and b) Plating - pour plate method.

COUNTING CHAMBER : Haemocytometer is used for counting spores of bacteria, fungi and PIB of viruses.

## STEPS :

FUNGAL SPORES : 1. Culture the fungus in suitable medium, 2. A quantity of 100 ml of sterile water is taken in 250 ml conical flask, 3. Add 20 ml of sterile water to culture and shake well, 4. Add the spore suspension to flask. Repeat 3 or 4 times, 5. To the spore suspension add two drops of Tween 80. Shake well, 6. Keep the flask in a mechanical agitator, 7. A thin film of suspension added to Haemocytometer, cover slip put and spores counted in low power of the microscope and 8. Mean of many counts taken.

**CALCULATION :** There are 400 small squares in the counting chamber of haemocytometer.

$$\begin{aligned} \text{Area of 400 small squares} &= 1 \text{ mm}^2 \\ \text{Area of 1 small square} &= \frac{1}{400} \text{ mm}^2 \end{aligned}$$

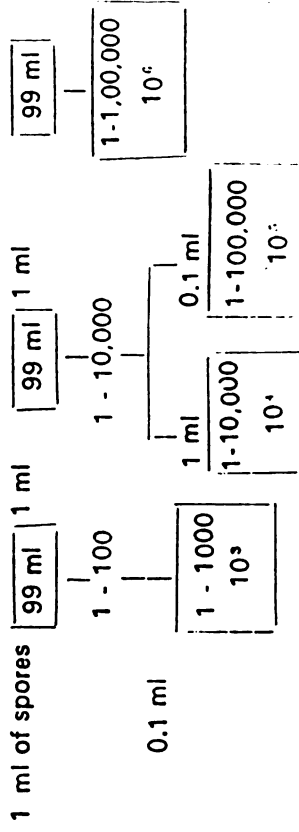
$$\begin{aligned} \text{Thickness of fluid standing between cover slip and haemocytometer} &= 0.1 \text{ mm} \\ \text{Volume of the fluid standing on each small square} &= \frac{1}{400} \times \frac{1}{10} = \frac{1}{4000} \text{ mm}^3 \\ \text{Supposing mean number of spores per small square} &= 2.6 \\ \text{Number of spores per ml} &= 2.6 \times 4000 \times 1000 \\ &= 10,40,000 \end{aligned}$$

If the original suspension has been further diluted, the dilution factor has to be taken into account. Similarly bacterial spores and PIB of viruses can be estimated. Based on this the quantity of infective unit per gram or ml can be standardised. The total number of cells obtained by this method will include both living and dead cells. If only the living cells capable of reproduction are to be counted, the 'colony count' method must be employed.

**COLONY COUNT METHOD** (counts of viable organisms for bacteria) : Dispense 9 ml aliquots in sterile saline in sterile tubes. Dilute 1 ml of the culture or suspension of the organism in saline to give 1-10, 1-100, 1-1000 etc. dilutions of the culture. Distribute 15 ml aliquots of melted nutrient agar in sterile plugged tubes, and keep them at 45°C. Add 1 ml of a suitable dilution of bacterial suspension to each agar tube, mix well and pour into a sterile petri dish. Allow to harden and incubate. All dilutions should be poured in triplicate. The colonies in the incubated petri dish are estimated. Work out the mean of three counts.

**POUR PLATE METHOD :** Start with 1 ml of liquid containing the organism. This stock solution is diluted with sterile water 100, 1000 or 10,000 times as required. These dilutions are expressed as 1-100, 1-1000 etc. which means 1 part of the suspen-

sion is diluted in 99 or 999 parts of water respectively. The required volume of the suspension is added to the petri plates, and then appropriate medium (about 20 ml) is added. Mix well without spilling and allow to solidify. Incubate the inverted plates at the required temperature.



After 5 days examine the plates and count the organisms or colonies. Multiply by the dilution factor to obtain the count in the original solution.

#### STEPS IN BIOASSAY

A. 1. Host insects or host insect substrate is treated with microbial organism. 2. Examine the treated insects and substrate frequently and observe for disease development in insects. 3. At definite intervals count the insects died due to disease. 4. Estimate the mortality percentage. 5. The 50% effective dose or ED<sub>50</sub> is determined.

B. Topical application of known quantity of infective unit of microorganism in Potters Tower. Data gathered on disease development and mortality. Probit analysis of the data carried out.

C. The semi-synthetic diet employed for rearing can be used as a vehicle for presenting the virus to be tested. The polyhedra at different concentrations is fed to the test insect and dosage-mortality determined. Similarly time-mortality can also be worked out.

#### SELECTED REFERENCES

- Finney, D. J. 1964. "Probit Analysis". A statistical treatment of the sigmoid response curve. 2nd ed. 318 pp. Cambridge University, London.
- Steiner, R. Y., M. Doudroff and E. A. Adelberg. 1970. General Microbiology. MacMillan India, pp. 873.