تأثير مستخلص المركبات التربينية الخام لنباتي الشبنت *Anethum graveolens* ونبات القات *Catha edulis* في أنسجة القناة الهضمية ليرقات الطور الرابع لبعوض *Culex pipienes* (Diptera:Culicidae)

زينب عبد الرضا جعباز
جامعة بابل /كلية العلوم

عصام كظوم عبود
جامعة بابل /كلية العلوم

surarahman@yahoo.com

الخلاصة :

هدف البحث الحالي الى معرفة تأثير مستخلص المركبات التربينية الخام لنباتي الشبنت *A.graveolens* ونبات القات *C.edulis* في انسجة الطور اليرقي الرابع لبعوض *Culex pipienes*، أذ تضمن هذا البحث استخدام تركيزين هما (20,2.5) ملغم/ مل من المستخلص التربيني الخام، واوضحت نتائج الدراسة النسجية لليرقات المعاملة بتركيز 20 ملغم/ مل من المستخلص المذكور لنبات القات ولمدة 24 ساعة من المعاملة ضمور طبقة الخلايا الظهارية المبطنة لمنطقة المعي الوسطي والخلفي لليرقة اي تحللها في حين تسبب التركيز ذاته لنبات الشبنت بظهور فرط تنسج hypeplasia لطبقة الخلايا الظهارية ويلاحظ هذا التأثير ايضا في التركيز 2.5 ملغم/مل لنبات القات أما عند التركيز 2.5 ملغم/مل لكلا النباتين فتسبب بتضخم hypertrophy الخلايا الظهارية وتباعدها عن بعضها disintegration وعدم انتضامها disorientation.

الكلمات المفتاحية : بعوض الكيولكس، نبات الشبنت، نبات القات .

Abstract:

The present research aimed to identification effects of crude terpenoid compound for tow plants Dill *Anethum graveolens* and Alkhat *Catha edulis* on fourth larval instra of *Culex pipienes*, this research involved tow concentration of plant extract which were used (20,2.5)mg/ml of crude terpenoid compounds extract, and histological results study showed of treated fourth larval instra in concentration 20 mg/ml of this extract of Alkhat plant and for 24 hour of treatment extinction epithelial cell layer enclosed to middle and hind gut of fourth larval instra so caused lysis but this concentration of dill plant caused view hyperplasia of epithelial cell and this effect in 2.5mg/ml concentration to Alkhat plant whearas in 2.5 mg/ml concentration of both plant caused hypertrophy, disintegration and disorientation of epithelial cell.

Keywords: culex pipienes , Anethum graveolens,Catha edulis

المقدمة :

تعد حشرة البعوض Mosquitoes من الحشرات ذات الأهمية الطبية وأن أحد أدوار حياتها هي الأطوار اليرقية التي تعد الهدف الرئيس في برامج مكافحة البعوض بسبب وفرتها في البيئة المائية مقارنة بالبالغات وعدم قدرتها على تغيير سلوكها لتجنب المبيدات اضافة الى شكلها المميز فتموت اليرقات قبل أن تنتشر الى بيئة الأنسان فتكون الأكثر هدفا في المكافحة لسهولة التعامل معها في البيئة المائية . (Linser *et al*., 2009; Nanditac, 2008; Chockalingam *et al*., 1990 ; Pathak and Dixit, 1988)

أن استخدام المبيدات العضوية المصنعة في مصادر المياه يسبب العديد من المخاطر للبيئة والأنسان لذلك تكون المبيدات الطبيعية المشتقة من النباتات تكون مناسبة لحل هذه المشاكل لأمتلاكها صفات غير متوفرة في المبيدات الكيميائية المصنعة منها عدم تلويثها للبيئة فهي تكون متخصصة بالأفة وغير مؤذية للأحياء الأخرى اضافة الى تحللها البايولوجي السريع (Promsiri *et al*.,2006;Zayed *et al*., 2006 ; Mittal and Subbarao,2003)

كذلك تؤثر المبيدات النباتية على القناة الهضمية ليرقات البعوض من خلال تأثيرها على طبقة الخلايا الظهارية المبطنة للأمعاء مثل مبيد pyrthrine الذي يأثر على الأرتباطات الخلوية (Clements,1996)، وبعضها تؤثر على الأجسام الدهنية fat bodies للحشرة، حيث ينتشر الجسم الدهني بشكل طبقة من الخلايا قريبة لجدار الجسم في منطقة الصدر والبطن أو بشكل فصوص تمتد الي تجويف الجسم أو يبطن بعض الأمعاء (Chapman,1998). ومما تقدم يهدف البحث الحالي الى معرفة تأثير مستخلص المركبات التربينية الخام لنباتي الشبنت *A.graveolens* ونبات القات *C.edulis* في أنسجة القناة الهضمية ليرقات الطور الرابع لبعوض *Cx.pipienes* .

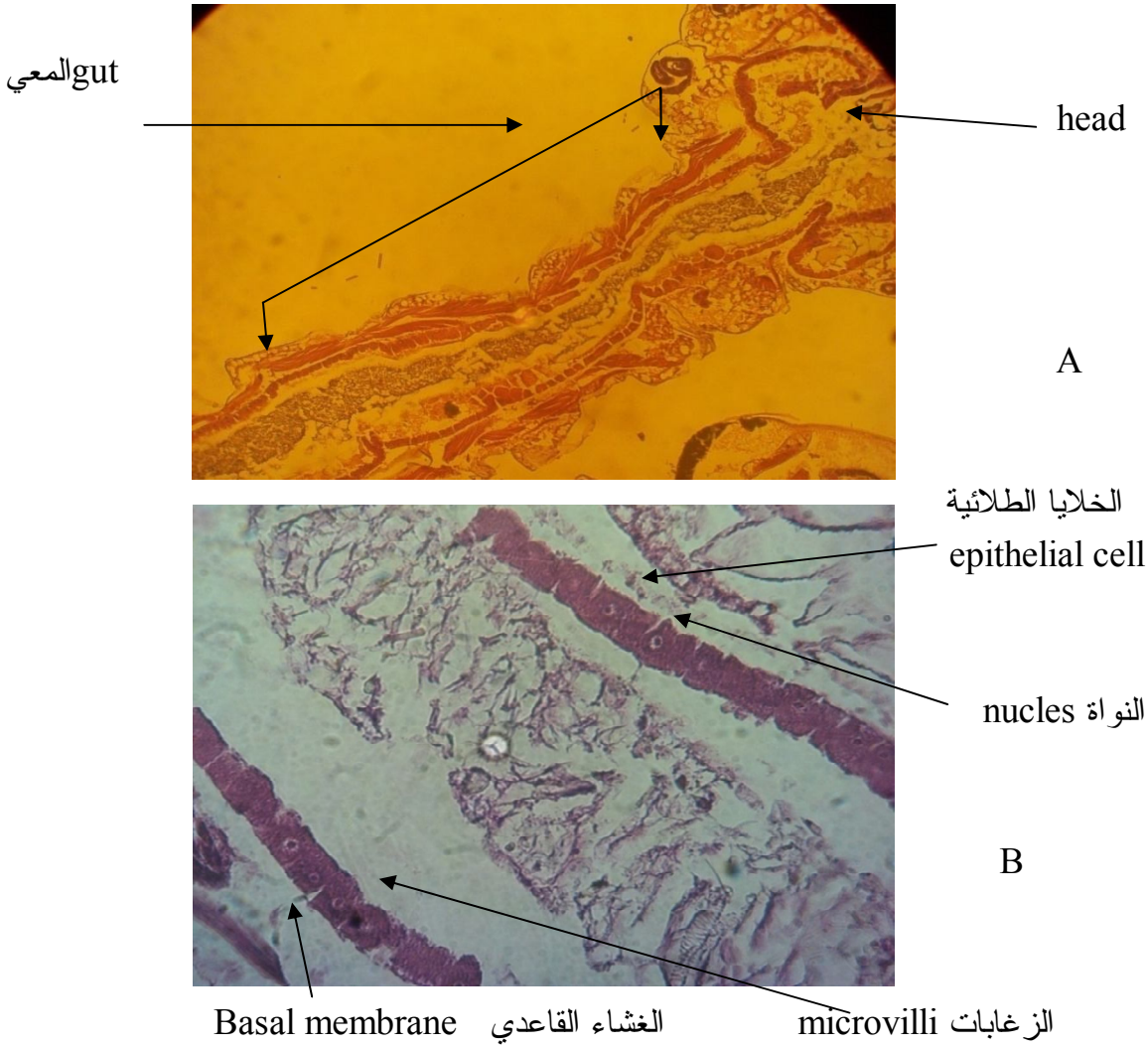
المواد وطرائق العمل : Materils and Methods

لغرض أجراء مستعمرة للحشرة أستخدمت مغرفة طويلة الذراع لجمع قوارب البيض من اماكن تصريف المياه في احدى مناطق محافظة بابل و وضعت في حاوية بلاستيكية ذو غطاء لنقلها الى المختبر، ثم نقلت الى أحواض بلاستيكية مملوءة بماء خال من الكلور وغذيت اليرقات بعد فقسها من قوارب البيض ب2 غم من مسحوق عليقة الفئران المكون من (الحنطة والذرة الصفراء والبروتين والرز) بنسبة (1:1:0.25:1) لكل حوض (الغزالي، 1999) مع مراعاة تبديل ماء الأحواض كل ثلاثة أيام لمنع تعفنه وأزالة قشور الأنسلاخ بواسطة ماصة صغيرة، وبعد خروج الكاملات تم تغذيتها على دم الطيور لأجل وضع البيض وأدامة المستعمرة وتم الحصول على الطور اليرقي الرابع من المستعمرة بعد حصول فقس لهذه البيوض بعد فصل كل طور لوحده لتحديد العمر اليرقي له ولأجل التشخيص أخذت عينات من الطور اليرقي الرابع والبالغات التابعة لهذا الجيل وحضرت لها شرائح لتشخيصها حسب الصفات التصنيفية الواردة في المفاتيح التصنيفية (عبد القادر، 2000).

لتحضير مستخلص المركبات التربينية الخام لنباتي الشبنت *A.graveolens* ونبات القات *C. edulis* استخدمت طريقة Harborne(1984) وذلك بأذابة 10 غم من المسحوق الجاف للنباتات قيد الدراسة وكلا على حده في 200 مل من الكلوروفورم بأستعمال جهاز السكسوليت Soxholetextractor ولمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة(45) م°، تم تركيز العينة الناتجة من الأستخلاص بواسطة المبخر الدوارRotary evaporator، ثم تركت لتجف في الفرن الكهربائي بدرجة (45-40) م°وأستعملت عبوات زجاجية نظيفة بعد وزنها وهي فارغة لحفظ المادة الجافة في الثلاجة لحين الأستعمال. استخدم 1مل من الكلوروفورم و 1مل من الكحول الأثيلي لأذابة 2غم من المستخلص التربيني وأكمل الحجم بالماء المقطر الى 100حتى يصبح المحلول الأساسي Stock solution ذو تركيز 2% اي مايعادل 20 ملغم /مل لأجل تقدير الفعالية الحيوية لمستخلص المركبات التربينية الخام للنباتات قيد الدراسة، ومن هذا المحلول الأساسي حضر التركيز (2.5) ملغم\مل، واستخدم 1 مل من الكحول الاثيلي و1مل من الكلوروفورم ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى (100) مل لغرض تحضير معاملة السيطرة .ولمعرفة تأثير المستخلص في اليرقات أستعملت أواني بلاستيكية تحتوي 50مل من تركيز مستخلص المركبات التربينية مضاف اليها 0.5 غم من عليقة الفئران وبواقع 3 مكررات و وضعت 10 يرقات من الطور اليرقي الرابع لكل مكرر بالأضافة الى معاملة السيطرة، وبعد 24ساعة من المعاملة اخذت اليرقات الهالكة وتم تحضير المقاطع النسجية لها حسب طريقة (Bancroft and Stevens, 1996).

النتائج والمناقشة :

يلاحظ من المقاطع النسجية للدراسة الحالية أن منطقة المعي في معاملة السيطرة للطور اليرقي الرابع لبعوض ***C. pipienes*** تنقسم الى ثلاث مناطق هي: منطقة المعي الأمامي foregut والمعي الوسطي midgut والمعي الخلفي hindgut وتتكون كل منطقة من طبقة واحدة من الخلايا الظهارية العمودية columnar مستندة على الغشاء القاعدي basal membrane وهذا الغشاء محاط من الخارج بألياف عضلية طولية ودائرية و تحتوي كل خلية



شكل رقم (1) منطقة المعي ليرقات الطور الرابع لبعوض *Cx.pipiens* لمعاملة السيطرة

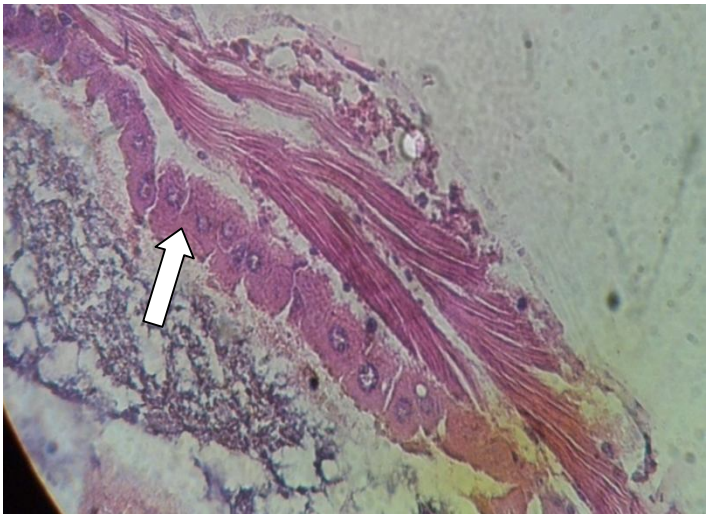
A- منطقة المعي الوسطي بقوة تكبير 4X

B- منطقة المعي الوسطي بقوة تكبير10X

من هذه الخلايا على نواة كبيرة محببة تحتل الجزء المركزي للخلية، ويحتوي النسيج الظهاري لمنطقة المعي على حافة مخططة بسبب وجود الزغابات الدقيقة microvilli التي تدعم معدل الأمتصاص مغطاة بواسطة غشاء peritrophic ويحيط هذا الغشاء بتجويف الأمعاء ليفصل النسيج الظهاري للأمعاء عن جزيئات الغذاء كما يلاحظ في شكل (1A,B).

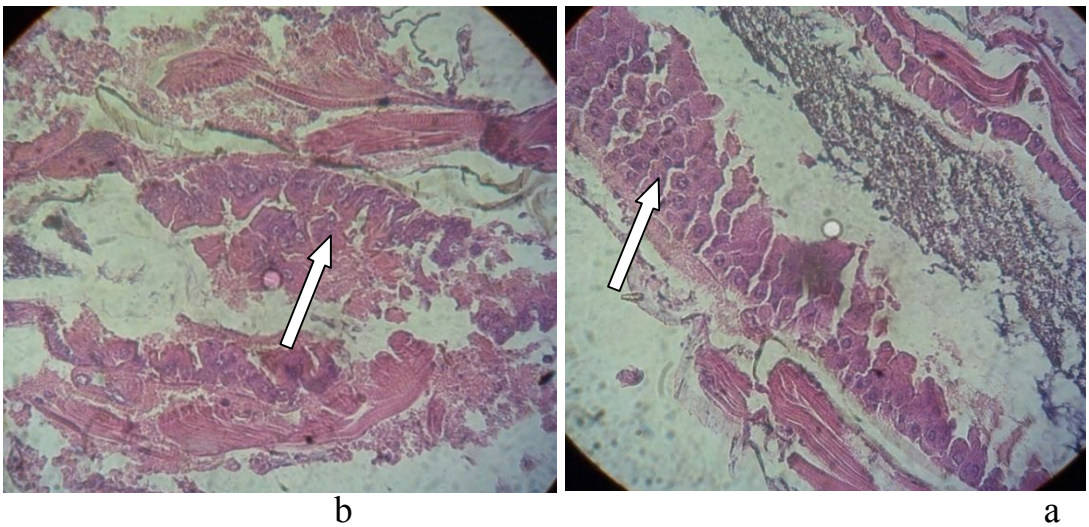
أما اليرقات المعاملة بالمستخلص التربيني الخام لنباتي القات ***C. edulis*** والشبنت ***A.graveolens*** فيلاحظ تأثر النسيج الظهاري لمنطقة المعي ويختلف هذا التأثير بأختلاف موقع النسيج الظهاري على طول منطقة الأمعاء وبأختلاف تركيز المستخلص من هذه التأثيرات مايلي:

١- **ظهور تضخم Hypertrophy** في بعض الخلايا الظهارية لمنطقتي المعي الوسطي والخلفي كما في شكل (2) عند المعاملة بتركيز 2.5 ملغم /مل لكل من المستخلص التربيني الخام لنباتي الشبنت والقات.



شكل رقم (2) تضخم الخلايا الظهارية لمنطقة المعي الوسطي والخلفي ليرقات الطور الرابع لبعوض *C.pipienes* بعد 24 ساعة من المعاملة بالمستخلص التربيني الخام لنبات القات *C.edulis* بتركيز 2.5 ملغم/مل قوة التكبير 10X

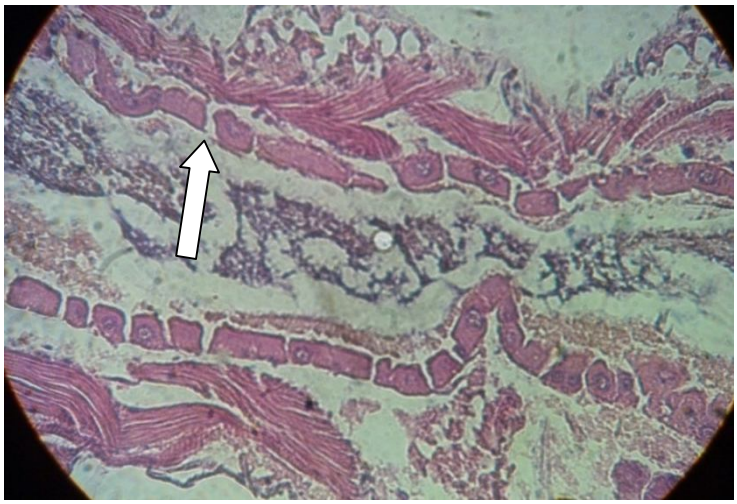
٢- ظهور فرط التنسج **Hyperplasia** (زيادة عدد الخلايا الظهارية في منطقتي المعي الوسطي والخلفي وعدم وضوح شكلها) كما في شكل (3) عند المعاملة بتركيز 2.5 ملغم / مل من المستخلص التربيني الخام لنبات القات ***C.edulis*** وبتركيز 20 ملغم /مل من المستخلص التربيني لنبات الشبنت ***A. graveolens***



b a

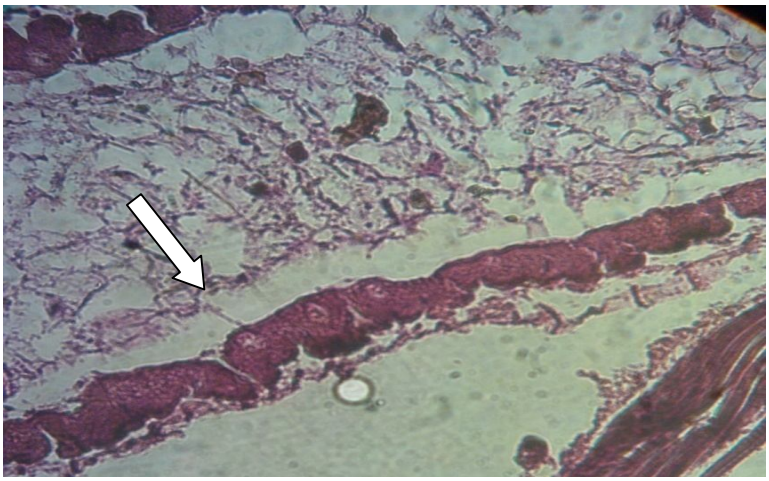
شكل رقم (3a,b) a- فرط التنسج Hyperplasia لمنطقة المعي الوسطي والخلفي ليرقات الطور الرابع لبعوض *C.pipienes* بعد 24 ساعة من المعاملة بالمستخلص التربيني الخام لنبات القات *C.edulis* بتركيز 2.5 ملغم / مل b- فرط التنسج لمنطقة المعي بعد 24 من المعاملة بالمستخلص التربيني الخام لنبات الشبنت *A.graveolens* بتركيز 20 ملغم / مل قوة التكبير 10X

٣- ظهور تفكك **Disintegration** للخلايا الظهارية المبطنة للأمعاء أي تباعدها عن بعضها البعض كما في شكل (4) عند المعاملة بتركيز 2.5 ملغم / مل من المستخلص التربيني الخام لنباتي القات والشبنت.



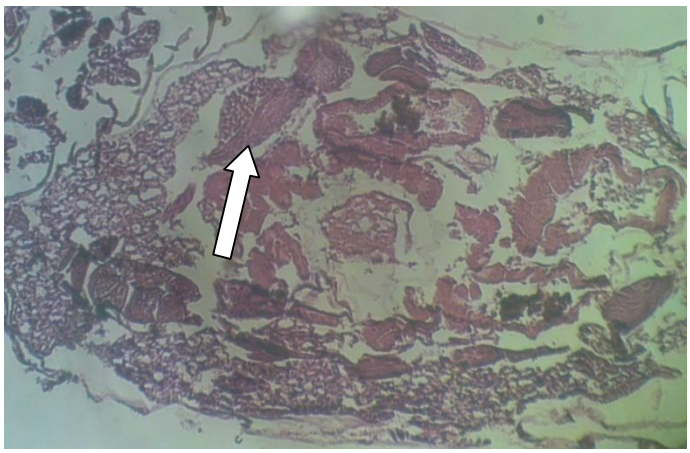
شكل رقم (4) تباعد الخلايا الظهارية لمنطقة المعي الوسطي والخلفي ليرقات الطور الرابع لبعوض *C.pipienes* بعد 24 ساعة من المعاملة لكل من المستخلص التربيني الخام لنبات القات *C.edulis* ونبات الشبنت *A.graveolens* بتركيز 2.5 ملغم / مل قوة التكبير 10X

٤- عدم أنتظام **Disoreintation** طبقة الخلايا الظهارية المبطنة لمنطقة الأمعاء كما في شكل (5) عند المعاملة بتركيز 2.5 ملغم / مل لكل من المستخلص التربيني الخام لنباتي القات والشبنت .



شكل رقم (5) عدم أنتظام الخلايا الظهارية لمنطقة المعي الوسطي والخلفي ليرقات الطور الرابع لبعوض *C.pipienes* بعد 24 ساعة من المعاملة بالمستخلص التربيني الخام لنبات القات *C.edulis* ونبات الشبنت وبتركيز 2.5 ملغم/مل قوة التكبير 10X

٥- ضمورأو تحلل الخلايا الظهارية أي انحلالها عند معاملتها بتركيز 20 ملغم / مل من المستخلص التربيني الخام لنبات القات ***C. edulis*** كما في شكل (6).



شكل رقم (6) ظمورأو تحلل الخلايا الظهارية لمنطقة المعي ليرقات الطور الرابع لبعوض *C.pipienes* بعد 24 ساعة من المعاملة بالمستخلص التربيني الخام لنبات القات *C.edulis* بتركيز 20 ملغم/مل قوة التكبير 10X

يلاحظ أغلب التأثير لمستخلصات نباتي القات ***C.edulis*** ونبات الشبنت ***A.graveolens*** كان على الخلايا الظهارية لمنطقة المعي ليرقات الطور الرابع للبعوض قيد الدراسة ويوجد عدة أنواع من هذه الخلايا منها الخلايا الواضحة clear cells التي تحتل الثلث الأول من الأمعاء، والنوع الأخر هي dark cells وكلا النوعين لها دور مهم بعملية تطور اليرقة (Rey *et al*.,1999)، أما الخلايا التجددية regenerative cells فهي المسؤولة عن تجديد النسيج الطلائي الهظمي فلها دور بعملية التحول metamorphosis فتبدأ بالأنقسام بالطور اليرقي الرابع وتنتهي بمرحلة العذراء فالتحول للبعوض يتضمن التحول الكامل لجدار جسم اليرقة مثل تجديد remodeling للقناة الهضمية لليرقة وأستبدال الخلايا الهضمية لليرقة digestive cell لذلك تأثير المركبات النباتية على القناة الهضمية لليرقة يتداخل بتطور الحشرة .(Nishiura and Ray, 2003)

من الدراسات النسيجية في هذا المجال دراسة , Charles(1987), Davidson and Titus(1987) Singh and Gil(1988) , Silva-Filha and Peixoto(2003) حول تأثير المستخلصات النباتية على النسيج الهظمي ليرقات الطور الرابع لبعوض ***C. pipienes*** وبينت دراسة Hamouda *et al.*(1996) تأثير مستخلص نبات *Artemisia judaica* على المعي الوسطي ليرقات البعوض قيد الدراسة ولاحظ وجود فجوات بالخلايا الظهارية وتضخم الخلايا الظهارية hypertrophy واندفاع محتويات الخلايا بأتجاه تجويف الأمعاء وفقدان الخلايا الظهارية لمظهرها وتحطم microvilli التي تبطن الحافات الداخلية للخلايا الظهارية للأمعاء وتزيد معدل الأمتصاص، أيضا تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Assar and EL-Sobky (2003) اذ لاحظوا تأثير المستخلصات المائية لنبات *M. chamomella* ونبات *Eichhornia crassipe* على النسيج الظهاري ليرقات الطور الرابع للبعوض المذكور بعد 24 ساعة من المعاملة وتسبب المستخلص بتضخم الخلايا الظهارية hypertrophy وتباعدها عن بعضها، وزيادة عددها hyperplasia،أيضا لاحظا تجمع كتلة من المواد الخلوية في الجزء الأمامي من منطقة المعي الوسطي وفقدان النسيج الظهاري لمظهره وأنتفاخ الجزء القمي للخلية الظهارية العمودية الشكل وبعض الأحيان تطاولها ممتدة الى تجويف الأمعاء، ايضا بينت دراسة Abed *et al*. (2007) بتأثر الخلايا العمودية لمنطقة المعي الوسطي وتكوين فجوات في سايتوبلازمها ليرقات بعوض *A. aegypti* بفعل المعاملة بزيوت نبات *Citrus reticulate*، أما دراسة Chaieb *et al*. (2009) بينت تأثير المركبات التربينية المعزولة من نبات *Cestrum parqui* على الطور اليرقي الرابع لبعوض *C.pipienes* ولاحظ تحطم طبقة الكيوتكل وتغير بشكل وحجم الخلايا الظهارية وتغيرات بجدار الأمعاء أذ يبتعد الجدار عن الغشاء البيروتروفي peritrophic membrane، في حين

أوضحت دراسة AL-Mehmadi and AL-Khalaf (2010) بتحطم الخلايا الظهارية العمودية الشكل للطور اليرقي الرابع لبعوض *C.quinquefasciatus* وهذا التأثير يزداد بزيادة فترة التعرض للمستخلص الكحولي لنبات *Melia azedarch* أيضا لاحظ تحطم microvilli وأندفاع محتويات الخلايا الظهارية الى تجويف الأمعاء وأبتعاد الخلايا عن بعضها، أما دراسة Almehmadi (2011) أوضحت تأثير مستخلص نبات *Matricharia chamomella* على الطور اليرقي الثالث لبعوض *Cx. quinquefasciatus* وتسبب المستخلص تحطم جدار الأمعاء وتحطم الزغيبات microvilli ووجود فجوات في سايتوبلازم الخلايا الظهارية ، أيضا تطابق نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة Kjanijon *et al.* (2012) حيث أوضح تأثير مستخلص نبات *Murraya paniculata* على يرقات بعوض *Cx. quinqufasciatus* ودراسة Pavanaundt *et al.* (2013) اذ أوضح تأثير المستخلص المائي لأوراق *Cassia siamea* على يرقات بعوض *A. aegypti* ، هذا وتتطابق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Perumalsawy *et al*. (2013) من حيث انحلال الخلايا الظهارية لمنطقة المعي الأمامي والخلفي ليرقات بعوض *A. aegypti* بفعل المستخلص القلويدي الخام لنبات *Melia azedarch* وكذلك تسبب المستخلص بتحطم gastric caeca المهمة بعملية نقل الأيونات .

كذلك بينت دراسة Kanitta and Wannea (2015) عدم أنتظام شكل الخلايا وزيادة حجمها hypertrophy وتحطم الزغيبات microvilli وملاحظة فجوات في سايتوبلازم الخلايا الظهارية لمعي يرقات الطور الرابع لبعوض *Cx.quinqufasciatus* بفعل المستخلص المائي لأوراق نبات *Cassia siamea* .

المصادر العربية :

عبد القادر،اياد عبد الوهاب،2000، دراسة تصنيفية لعائلة البعوض (Diptera:Culicidae) في محافظة البصرة .اطروحة دكتوراه. كلية علوم \جامعة البصرة .122صفحة.

الغزالي،مشتاق طالب كريم، 1999، الروز الحيوي لمستخلصات نباتيه مختلفه لاوراق فرشاة البطل Skeels *Callistemon citrinus* (Curtis) في بعض جوانب حياتية بعوض الكيولكس.(*Culexpipiens*L Diptera:Culicidae) رسالة ماجستير. كلية العلوم/جامعة بابل.83 صفحة.

المصادر الأجنبية : References

Abed, R. A.; Cavasin, G. M.; Silva, H. H. G.; Geris, R. and Silva, I. G., 2007,Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulate* Ducke (Leguminosae). Rev. Patol. Trop., **36**: 75–86.

Almehmadi, R. M., 2011, Larvicidal,Histopathological and Ultra-structure studies of *Matricharia chamomella* extracts against the rirt valley fever mosquito *culex quinquefasciatus* (Culicidae:Diptera). Journal of Entomology., 8(1):63-72.

Alves, S. N.; Serrao, J. E. and Melo, A. L., 2010, Alterations inthe fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. Micron., **41**: 592-597.

Arruda, W. C.; Oliveira, G. M. and Silva, I. G, 2003, Toxicidade do extrato etanólico de Magonia pubescens sobre larvas de *Aedes aegypti*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **36**: 17–25.

Assar, A. A. and El-Sobky, M. M., 2003, Biological and histopathological studies of some plant extracts on larvae of *Culex pipienes* (Diptera:Culicidae) .J.Egypt.Soc.Parasitol.,189-200.

Bancroft, J.D. and Stevens, A., 1996, *Theory* and practice of histological techniques. 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 766.

Charles, J. F., 1987, Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. Annales de l'Institut Pasteur/Microbiol., **138**: 471–484.

Clements, A. N., 1996, The Biology of Mosquitoes, vol. **1**.Chapman & Hall, London.

Chapman, R. F., 1998, The Insects: Structure and Function, fourth ed . Cambridge University Press , Cambridge.

Davidson, E. W. and Titus, M. ,1987, Ultrastructural effects of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin on cultured mosquito cells. J. Invertebr. Pathol., **50**, 213–220.

Hamouda, L. S.; Elyassaki, W. M. and Hamed, M. S., 1996, Toxicity and histopathological effects of *Artemisia judaic* and *Anagallis arvensis* extracts on *Culex pipienes* larvae. J.Egypt. Ger.Soc.Zool.,**20**:43-60.

Harborne, J. B., 1984, .Intrduction to ecological biochemistry Academic press. London 2nd Ed .278pp.

Kanitta, J. and Wannee, J., 2015 Larvicidal and Histopathological Effects of *Cassia siamea* Leaf Extract against *Culex quinquefasciatus* . Tropical Life Sciences Research., 26(2), 15–25.

Kjanijou, M.; Jiraungkoorskul, K.; Kosai, P. and Jiraungkoorskul, W., 2012, Effect of *Murraya paniculata* leaf extract against *Culex quinquefasciatus* larva. Asian Journal of Biological Sciences., 5(4): 201–208.

Mehmadi, R. M. and Al-Khalaf, A. A., 2010, Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera:Culicidae).Journal of King SaudUniversity(Science).,**22**:77–85.

Nanditac, A. G., 2008, Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum berry* extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*. BMC Complementary and Alternative Medicine.

Nishiura, J. T.; Ho, P. and Ray, K., 2003, Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. J. Med. Entomol. **40**: 498–507.

Pathak, A. K. and Dixit, V. K., 1988, Insecticidal and insect repellent activity of essential oils of *Tridax procumbens* and *Cyathocline lyrata*. Fitoterapia., **59**: 211–219 .

Pavananundt, P.; Jiraungkoorskul, K.; Kosai, P. andJiraungkoorskul, W., 2013, Larvicidal properties of *Cassia siamea* leaf against *Aedes aegypti* larvae. International Journal of Modern Agriculture **2**(1): 1–8 .

Perumalsamy, H.; Kim, J.R.; Jung, J.W., Ahn, Y. J. and Kwon, H.W., 2013, Novel histopathological and molecular effects of natural compound pellitorine on larval midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*. Plosone.**, 8**: 226-339.

Promsiri, S.; Naksathit, A.; Kruatrachue, M. and Thavara, U., 2006, Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti*(Diptera :Culicidae)and other effects on a non target fish .Insect Sci., **13** :179-188.

Rey, D.; Pautou, L.; Marie-Paule, M.; Meyran, S. and Jean-Claude,M., 1999, Histopathologicaleffects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic diptera larvae. J. Invertebr. Pathol. ,**73**: 173–181.

Silva-Filha, M. H. and Peixoto, C. A., 2003, Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. Pestic. Biochem. Physiol., 77: 138–146.

Singh, G. J. and Gil, S. S., 1988, An electron microscope study of the toxic action of Bacillus sphaericus in Culex quinquefasciatus larvae. J. Invertebr. Pathol. **52**: 237–247.

Zayed, A. B.; Szumlas, D. E. and Hanafi, A., 2006, Use of bioassay and microplate assay todetect and measure insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from filariasis endemic area of Egypt. J. Amer. Mosq. Contr. Ass.,**22**: 473-482.