ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ ต่อลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน

Efficacy of Endophytic Fungi Extracts on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Larvae

*อรัญญา ภิญรัตนโชติ วท.ม. (จุลชีววิทยา)** *Aranya Pinyorattanachot M.Sc. (Microbiology)**
*มนต์ชนก เต็มภาชนะ วท.ม. (จุลชีววิทยา)** *Monchanok Tempachana M.Sc. (Microbiology)**
*ณิฎฐา เสนาพงศ์ วท.ม.(วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก)** *Nidtha Senapong M.Sc. (Applied Oral Health Science)**
*คณพศ ทองขาว วท.ม.(กีฏวิทยา)** *Kanaphot Thongkhao M.Sc. (Entomology)**
*อุบลรัตน์ นิลแสง วท.บ.(จุลชีววิทยา)*** *Ubolrat Ninsaeng B.Sc. (Microbiology)***

**สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช* **Office of Disease Prevention and Control, Region 11 Nakhon Si Thammarat*
***ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงที่ 11.3 จังหวัดสุราษฎร์ธานี* ***Vector-Borne Diseases Control Center 11.3, Surat Thani*

Received: February 13, 2025
Revised: May 14, 2025
Accepted: July 23, 2025

บทคัดย่อ

การใช้สารเคมีกำจัดลูกน้ำยุงและยุงตัวเต็มวัยอย่างแพร่หลายมีผลทำให้เกิดการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีของยุง ทั้งยังเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน โดยแยกตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 45 สายพันธุ์ จากพืชในสวนยาง สวนปาล์ม และสวนผลไม้ จำนวน 300 ตัวอย่าง เตรียมสารสกัดน้ำเลี้ยงเซลล์และจากเซลล์เชื้อราที่ความเข้มข้น 500 ppm เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายโดยวิธี Larvicidal selective bioassay พบว่า มีสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ จำนวน 5 ชนิดที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน ได้แก่ *Arcopilus cupreus, Endomelanconiopsis endophytica, Nemania primolutea, Penicillium citrinum* และ *Trichoderma reesei* มีสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ 10 ชนิด ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายสวน ได้แก่ *Neopestalotiopsis sp., Nodulisporium sp., Endomelanconiopsis endophytica Neodeightonia phoenicum, Penicillium steckii, Phyllosticta capitalensis, Pseudopithomyces maydicus, Fusarium sp., Talaromyces aurantiacus* และ *Colletotrichum sp.* ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายด้วยวิธี Larvicidal bioassay dose พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เชื้อราที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ดี ได้แก่ เชื้อรา *Nemania primolutea* และ *Arcopilus cupreus* ที่คัดแยกจากต้นปาล์มและต้นมังคุด พบอัตราการตายลูกน้ำยุงลายบ้านร้อยละ 80 และ 77 ตามลำดับ ส่วน *Neopestalotiopsis* sp., *Neodeightonia phoenicum* ที่คัดแยกจากสวนปาล์มและสวนยาง พบอัตราการตายลูกน้ำยุงลายสวนร้อยละ 92 และ 73 ตามลำดับ ผลการวิจัยนี้พบสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงลาย โดยสามารถต่อยอดเป็นสารสกัดแบบผงและสเปรย์ เพื่อเป็นทางเลือกในการควบคุมโรคติดต่อนำโดยยุงลาย

คำสำคัญ: ประสิทธิภาพ สารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ ลูกน้ำยุงลายบ้าน ลูกน้ำยุงลายสวน

Corresponding Author: อรัญญา ภิญโญรัตนโชติ *E-mail: vbdlab11@gmail.com*

Abstract

Chemical substances are commonly used to eliminate mosquito larvae and adult mosquitoes. However, their widespread use has led to the development of resistance in mosquito populations and poses risks to human health and the environment. This study aims to discover natural extracts from endophytic fungi that are effective in killing *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae.A total of 300 plant samples were collected from rubber, palm, and fruit plantations. From these, 45 endophytic fungal species were isolated based on colony morphology, mycelial characteristics, and nucleotide sequencing of the ITS region. The fungi were cultured to prepare both cell culture and cell extracts at a concentration of 500 ppm. These extracts were tested for larvicidal activity using the larvicidal selective bioassay method.Results showed that five fungal species, including *Arcopilus cupreus, Endomelanconiopsis endophytica, Nemania primolutea, Penicillium citrinum,* and *Trichoderma reesei were effective against Aedes aegyti larvae.* Meanwhile, ten species were effective against *Aedes albopictus* larvae, including *Neopestalotiopsis sp., Nodulisporium sp., Endomelanconiopsis endophytica, Neodeightonia phoenicum, Penicillium steckii, Phyllosticta capitalensis, Pseudopithomyces maydicus,Fusarium sp., Talaromyces aurantiacus* and *Colletotrichum sp.* Further larvicidal bioassay dose testing at 100 ppm revealed that *Nemania primolutea* and *Arcopilus cupreus*, isolated from palm and mangosteen trees, achieved mortality rates of 80 and 77% against *Aedes aegypti* larvae, respectively. For *Aedes albopictus*, *Neopestalotiopsis sp.* and *Neodeightonia phoenicum* (from palm and rubber plantations) showed high efficacy with mortality rates of 92 and 73%. These findings highlight the potential of endophytic fungal extracts as eco-friendly alternatives to chemical larvicides. The identified extracts can be further developed into powder or spray formulations for mosquito-borne disease control programs.

Keywords: Efficacy, Endophytic Fungi extracts, *Aedes aegypti* larvae, *Aedes albopictus* larvae

บทนำ

ในปัจจุบันโรคติดต่อที่นำโดยยุงได้แก่โรคไข้เลือดออก โรคไข้ซิกา โรคมาลาเรีย ยังคงเป็นปัญหาในทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ นอกจากการรักษาตามอาการแล้วสิ่งสำคัญคือการป้องกันควบคุมโรค ซึ่งประเทศไทยได้มีมาตรการในการกำจัดลูกน้ำยุงและการทำลายยุงตัวเต็มวัยโดยใช้สารเคมีกันอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการดื้อสารเคมีกำจัดแมลงของยุง[1] นอกจากนี้แล้วยังเป็นอันตรายกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยควบคุมลูกน้ำยุงลายได้

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ใช้กำจัดแมลงกำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน มีสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายกลุ่มที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพจนมีการนำไปพัฒนาเพื่อผลิตเป็นยารักษาโรค การป้องกันโรคบางชนิดหรือใช้ในอาหารเสริมต่าง ๆ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) เป็นสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ สามารถออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย หรือมีฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุง เป็นต้น[2] นอกจากนี้ยังมีการวิจัยพบว่าเชื้อราบางชนิดอาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืชแบบภาวะพึ่งพาอาศัยโดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช เรียกว่าราเอนโดไฟต์ สามารถแยกได้จากพืชหลายชนิด เช่น หญ้าแห้ง ธัญพืช รวมถึงพืชผลทางการเกษตรอื่น ๆ และสามารถแยกได้จากหลายส่วนของพืช เช่น ลำต้น ใบ เป็นต้น โดยพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่อาศัยในต้นไม้ถูกนำไปใช้ในทางการแพทย์ ไม่เพียงแต่ผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางยา ได้แก่ สารต้าน

มะเร็ง ต้านเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น แต่ยังรวมถึงนำมาใช้เป็นสารกำจัดลูกน้ำยุงต่าง ๆ[8] โดยเฉพาะลูกน้ำยุงลายซึ่งเป็นพาหะนำโรคสำคัญหลายโรค จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์จากต้นอินทผลัม สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้โดยการเข้าไปทำลาย Epithelial cell ในผนังกระเพาะอาหารตอนกลางของลูกน้ำทำให้ลูกน้ำตายได้[9] ซึ่งราเอนโดไฟต์เป็นเชื้อราที่สามารถสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น Taxol ในระยะเวลาสั้นกว่าการสังเคราะห์สารเดียวกันจากพืชโดยตรง[6] ประกอบกับการสกัดสารออกฤทธิ์จากราเอนโดไฟต์มีข้อจำกัดน้อยกว่าการสกัดจากพืชทำให้สามารถสกัดได้ทุกฤดูกาลและได้ในปริมาณมาก ที่สำคัญสามารถช่วยลดการทำลายสิ่งแวดล้อมและปลอดภัยกับมนุษย์ ดังนั้นสารสกัดธรรมชาติจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ใช้ในการกำจัดแมลงนำโรคจึงเป็นอีกทางเลือกในการนำมาใช้กำจัดลูกน้ำยุง[7] โดยเฉพาะยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ที่เป็นพาหะสำคัญของโรคติดต่อนำโดยยุงลายและนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ในลำดับต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อค้นหาเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ให้สารออกฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน
2. ทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ ในการออกฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวนในห้องปฏิบัติการ
3. วิเคราะห์ความเป็นไปได้ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย

วิธีดำเนินการวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ

สมมุติฐานการวิจัย

เชื้อราเอนโดไฟต์สามารถให้สารออกฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาโดยการแยกเชื้อราธรรมชาติจากพืชในท้องถิ่นจังหวัดนครศรีธรรมราช ได้แก่ สวนยาง สวนปาล์ม และสวนผลไม้ (มังคุด เงาะ ลองกอง ทุเรียน) นำมาสกัดสารเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวนด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรเป็นเชื้อราที่แยกจากส่วนต่าง ๆ ของต้นปาล์ม ยาง และผลไม้ จากสวนในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช

ขนาดตัวอย่างและวิธีสุ่มตัวอย่าง

เก็บเชื้อราจากสวนปาล์ม สวนผลไม้ และสวนยาง จำนวน 300 ต้น ในพื้นที่ 5 อำเภอ โดยเลือกแบบเฉพาะเจาะจง เก็บตัวอย่าง อำเภอละ 60 ต้น ด้วยวิธีสุ่มอย่างง่าย นำมากำหนดเป็นรหัสตัวอย่าง ประกอบด้วย รหัสอำเภอ รหัสสวน และลำดับตัวอย่าง

วัสดุ เครื่องมือและวิธีการ

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ เอทานอล 70% (องค์การเภสัชกรรม, ประเทศไทย) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10% (Merk, เยอรมัน) Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, Bacton, Dickinson and company, สหรัฐอเมริกา) Potato Dextrose Broth (PDB) (Difco, Bacton, Dickinson and company, สหรัฐอเมริกา) Absolute ethyl acetate (Merk, เยอรมัน) น้ำกลั่นสเตอไรด์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (GPH, ไทย) กลีเซอรอล 99.5% (kemaus, ออสเตรเลีย) GenepHlowTM Gek/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., ไต้หวัน) Streptomycin (M & H Manufacturing, ไทย) Sodium sulphate anhydrous (Labscan, RCI labscan limited, ไทย) methanol (Merk, เยอรมัน) hexane (Merk, เยอรมัน) Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Labscan, RCI labscan limited, ไทย) สารละลาย temephos ความเข้มข้น 1 ppm (Golden place Trading (Thailand) Company Limited, ไทย) และ Lactophenol cotton blue (Hi-media, สหรัฐอเมริกา)

เครื่องมือ

จานเพาะเชื้อสเตอไรด์ ขนาด 90 มิลลิเมตร (Hycon, สหรัฐอเมริกา) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (whatman, อังกฤษ) ขวดฝาเกลียวขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร (Duran, เยอรมัน) Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen, สหรัฐอเมริกา) Cryo rack ขนาด 100 ช่อง (SPL Life Sceince, สหรัฐอเมริกา) ขวดฉีดน้ำฝอย ขนาด 500 มิลลิลิตร (ไทย) ด้ามมีดผ่าตัดสแตนเลส No.4 และ ใบมีดผ่าตัดสแตนเลส No.22 (Feather, ญี่ปุ่น) กรรไกรผ่าตัดปลายแหลม ขนาด 150 มิลลิเมตร (Mira) บีกเกอร์ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร ตู้ปลอดเชื้อ (Esco, สหรัฐอเมริกา) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Tommy, FLS-1000, TOMY Digital Biology, ญี่ปุ่น) กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) แบบ 2 ตา (Olympus CX23, Olympus, ญี่ปุ่น) กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope) รุ่น Olympus CX23 (Olympus, ญี่ปุ่น) เครื่อง deep freezer (Panasonic Corporation, ญี่ปุ่น) เครื่อง Freeze dry (กฤษเหรียญทอง, ไทย) เครื่องกลั่นระเหย (Heidolph, เยอรมนี) และตะเกียงแอลกอฮอล์พร้อมไส้ตะเกียง

วิธีดำเนินการ

1. เก็บตัวอย่างพืชโดยเก็บส่วนของเปลือกไม้ ขนาด 8x6 เซนติเมตร 2 ตัวอย่างต่อต้น เนื้อไม้ ขนาด 3x3 เซนติเมตร 2 ตัวอย่างต่อต้น ราก ขนาด 3x3 เซนติเมตร 1 ตัวอย่างต่อต้น ใบ ก้านและกิ่ง อย่างละ 5 ตัวอย่างต่อต้น

2. การคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์เพื่อเตรียมสารสกัด

2.1 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ ล้างชิ้นส่วนของตัวอย่างด้วยน้ำสะอาดที่เปิดไหลผ่านเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตัดตัวอย่างเป็นชิ้นขนาด 1 เซนติเมตร นำมาฆ่าเชื้อโดยแช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน NaOCl 1% เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นส่วนพืชที่ผึ่งแห้งแล้วมาเพาะเชื้อบนอาหาร PDA โดยเติมยาปฏิชีวนะ (คานามัยซิน) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน เมื่อพบว่ามีเชื้อราเจริญขึ้น ทำการตัดส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา (hyphal tip) ภายใต้กล้อง Stereo microscope นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วแบ่งเชื้อราเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ส่วนที่ 2 ทำการเก็บเชื้อใน 15% กลีเซอรอล แล้วนำไปแช่ใน deep freezer อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำเชื้อราที่ได้โดยเลือกชนิดที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเส้นใยของเชื้อรามีความแตกต่างกัน ส่งจำแนกชนิดยังศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี ชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ด้วยวิธี Modified CTAB method[4]

2.2 การเพาะเลี้ยงและเตรียมสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ นำชิ้นส่วนของเชื้อราเอนโดไฟต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน ตัดชิ้นส่วนบริเวณของขอบโคโลนีให้มีขนาดชิ้นละ 1x1 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน นำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดมาทำการกรองเส้นใยของเชื้อราออก โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ได้องค์ประกอบ 2 ส่วน คือ ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์และเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ด้วย Ethyl acetate โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อราต่อ Ethyl acetate ในอัตราส่วน 2:1 ทำการสกัด 2 ครั้ง นำมาใส่สารกำจัดน้ำ คือ Sodium sulphate anhydrous อัตราส่วน 2:1 กรองแล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dry ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน

การสกัดเส้นใยเชื้อราเอนไฟต์ทำโดยนำเส้นใยของเชื้อราแช่ใน Methanol จนท่วมเซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารละลาย Methanol ไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยตัวทำละลายบางส่วนออก จากนั้นเติมน้ำลงไป จนท่วมเซลล์ แล้วนำไปสกัดด้วย Hexane ในอัตราส่วน 2:1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง นำเฉพาะส่วนที่เป็นชั้นน้ำ ไปสกัดต่อด้วย Ethyl acetate ในอัตราส่วน 2:1 และทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง

ซึ่งจากการสกัดดังกล่าวได้สารสกัด Cell ethyl acetate นำสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์จากเซลล์ของเชื้อรามาทำให้แห้ง โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเครื่องกลั่นแยกสาร (Rotary evaporator) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน ดัดแปลงจากวิธีของ วรรณฤดี หิรัญรัตน์[2]

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน

3.1 การทดสอบด้วยวิธี Larvicidal selective bioassay

แบ่งตัวอย่างเป็นกลุ่มทดสอบและกลุ่มเปรียบเทียบ โดยนำสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm จำนวน 1,000 มิลลิลิตร แบ่งสารสกัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์จำนวน 4 ใบ (4 ซ้ำ) ซึ่งเป็นการทดสอบซ้ำในสภาวะเดียวกัน และห้องปฏิบัติการเดียวกัน เติมลูกน้ำยุงวัยที่ 3 จำนวน 25 ตัวต่อบีกเกอร์ สำหรับชุดควบคุมที่เป็น Negative control ใช้สาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นเดียวกับสารสกัด และ Positive control ใช้สารละลาย Temephos ความเข้มข้น 1 ppm โดยทำเช่นเดียวกับสารสกัด บันทึกอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และเวลาที่เริ่มใส่ลูกน้ำ หลังครบเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนลูกน้ำที่ตายในแต่ละบีกเกอร์ โดยลูกน้ำที่ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ให้ตัดสินว่าตาย บันทึกข้อมูลในแบบบันทึกผลการทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีจากสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์

3.2 การทดสอบด้วยวิธี Larvicidal bioassay dose

แบ่งตัวอย่างเป็นกลุ่มทดสอบและกลุ่มเปรียบเทียบ โดยการนำสารสกัดที่ให้ผลอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 500 ppm มาทดสอบต่อ โดยใช้ 5 ความเข้มข้นสารสกัดที่ 100, 200, 300, 400 และ 500 ppm ใส่ในบีกเกอร์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 4 ใบ (4 ซ้ำ) สำหรับชุดควบคุมที่เป็น Negative control ใช้สาร DMSO ที่ความเข้มข้นเดียวกับสารสกัด และ Positive control ใช้สารละลาย Temephos ความเข้มข้น 1 ppm และเติมลูกน้ำยุงวัยที่ 3 จำนวน 25 ตัวต่อบีกเกอร์ สังเกตการตายของลูกน้ำเมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนลูกน้ำที่ตาย นำอัตราการตายทั้ง 4 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยคิดเป็นอัตราการตาย

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา นำเสนอ จำนวน ค่าเฉลี่ย อัตราการตายของลูกน้ำ ปรับค่าอัตราการตายโดยใช้ Abbott's formula ดังนี้[3]

$$\text{อัตราการตาย} = \frac{\text{อัตราการตายของลูกน้ำทดสอบ} - \text{อัตราการตายของลูกน้ำเปรียบเทียบ}}{100 - \text{อัตราการตายของลูกน้ำเปรียบเทียบ}} \times 100$$

ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์

สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้จำนวน 60 ตัวอย่าง จาก 300 ตัวอย่าง เป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ที่พบในต้นปาล์ม 34 ตัวอย่าง ยาง 15 ตัวอย่าง และผลไม้ 11 ตัวอย่าง ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของราเอนโดไฟต์สามารถแยกได้ 45 สายพันธุ์ มีสายพันธุ์ที่พบซ้ำ 9 สายพันธุ์ ไม่พบซ้ำ 36 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิด จำนวน และการพบซ้ำของเชื้อราเอนโดไฟต์ในตัวอย่างต้นปาล์ม ยาง และผลไม้ (n=60)

ชนิดเชื้อราเอนโดไฟต์	จำนวน (สายพันธุ์)	พบซ้ำ (ตัวอย่าง)	รวม (ตัวอย่าง)
Daldinia eschscholtzii, Nigrospora aurantiaca	2	4	8
Fusarium solani, Nigrospora oryzae	2	3	6
Arcopilus cupreus, Colletotrichum sp., Fusarium sp., Nemania primolutea, Phomopsis sp.	5	2	10
Nigrospora pyriformis, Fusarium pseudoanthophilum, Neopestalotiopsis eucalypticola, Neodeightonia phoenicum, Penicillium steckii, Neopestalotiopsis sp., Albifimbria terrestris, Marasmiellus sp., Pestalotiopsis papuana, Fusarium equiseti, Trichoderma sp., Geotrichum candidum, Colletotrichum gigasporum, Pseudopestalotiopsis sp., Colletotrichum siamense, Neopestalotiopsis chrysea, Trichoderma reesei, Fusarium incarnatum, Xylaria sp., Diaporthe hongkongensis, Humicola fuscoatra, Pleiocarpon livistonae, Aspergillus ochraceopetaliformis, Xylaria feejeensis, Endomelanconiopsis endophytica, Penicillium citrinum, Hypoxylon sp., Nigrospora camelliaesinensis, Phyllosticta capitalensis, Nigrospora sp., Fusarium proliferatum, Fusarium decemcellulare, Talaromyces aurantiacus, Pseudopithomyces maydicus, Penicillium shearii, Annulohypoxylon sp.	36	1	36

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์

2.1 การทดสอบด้วยวิธี Larvicidal selective bioassay

ผลการทดสอบสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 45 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน พบว่ามีกลุ่มตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์ จำนวน 5 ชนิด ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยแยกเป็นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ จำนวน 1 ชนิด คือ *Nemania primolutea* พบค่าเฉลี่ยอัตราตายของลูกน้ำยุงลายบ้านร้อยละ 100 มีสารสกัดจากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 4 ชนิด คือ *Endomelanconiopsis endophytica*, *Penicillium citrinum* และ *Arcopilus cupreus* และ *Trichoderma reesei* พบค่าเฉลี่ยอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านร้อยละ 100, 100, 100 และ 81 ตามลำดับ

ผลการทดสอบสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ 45 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายสวน พบว่ามีกลุ่มตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 10 ชนิด ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายสวนได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยมีสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Neopestalotiopsis* sp., *Nodulisporium* sp., *Endomelanconiopsis endophytica* ค่าเฉลี่ยอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายสวนร้อยละ 100 และสารสกัดจากเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 8 ชนิดได้แก่ *Endomelanconiopsis endophytica*, *Neodeightonia phoenicum*,

Penicillium steckii, *Phyllosticta capitalensis*, *Pseudopithomyces maydicus*, *Fusarium* sp. *Talaromyces aurantiacus* และ *Colletotrichum* sp. พบค่าเฉลี่ยอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายสวนร้อยละ 100, 96, 96, 95, 93, 91, 81 และ 69 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราตายต่อร้อยของลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวนด้วยสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ความเข้มข้น 500 ppm จำแนกตามชนิดเชื้อราและสารสกัด

เชื้อราเอนโดไฟต์	อัตราตายด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา					อัตราตายด้วยสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา				
	บีกเกอร์				อัตราตายเฉลี่ย	บีกเกอร์				อัตราตายเฉลี่ย
	1	2	3	4		1	2	3	4	
ยุงลายบ้าน										
Arcopilus cupreus	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100
Endomelanconiopsis endophytica	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100
Nemania primolutea	100	100	100	100	100	20	60	40	4	31
Penicillium citrinum	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100
Trichoderma reesei	0	0	0	0	0	88	84	80	72	81
Positive control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ยุงลายสวน										
Colletotrichum sp.	0	0	0	0	0	76	72	64	64	69
Endomelanconiopsis endophytica	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Fusarium decemcellulare	52	50	45	48	48	0	0	0	0	0
Fusarium sp.	0	0	0	0	0	84	84	96	100	91
Neodeightonia phoenicum	0	0	0	0	0	100	100	92	92	96
Neopestalotiopsis sp.	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0
Nodulisporium sp.	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0
Penicillium steckii	0	0	0	0	0	100	100	92	92	96
Phyllosticta capitalensis	0	0	0	0	0	100	92	92	96	95
Pseudopithomyces maydicus	0	0	0	0	0	100	84	92	96	93
Talaromyces aurantiacus	0	0	0	0	0	80	72	92	80	81
Positive control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี Larvicidal bioassay dose

นำสารสกัดที่แสดงให้เห็นว่ามีอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 500 ppm โดยใช้สารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ ที่ 100, 200, 300, 400 และ 500 ppm พบว่า สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้มากกว่า *Endomelanconiopsis endophytica* ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 100 ppm จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Nemania primolutea* คิดเป็นค่าเฉลี่ยของ

อัตราการตายร้อยละ 80 ส่วนสารสกัดจากเส้นใยเชื้อราที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้มากร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 100 ppm จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Arcopilus cupreus*, *Trichoderma reesei* และ *Penicillium citrinum* คิดเป็นค่าเฉลี่ยอัตราการตายร้อยละ 77, 64 และ 52 ตามลำดับ นำสารสกัดที่มีอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายสวนมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 500 ppm ทดสอบกับสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 100, 200, 300, 400 และ 500 ppm พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายสวนได้มาก ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 100 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบ จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Neopestalotiopsis* sp. พบค่าเฉลี่ยอัตราการตายร้อยละ 92 ส่วนสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายสวนได้มาก ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 100 ppm จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Neodeightonia phoenicum* พบค่าเฉลี่ยอัตราการตายร้อยละ 73 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่สามารถฆ่ายุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) โดยจำแนกตามชนิดเชื้อราและสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราและจากเส้นใยเชื้อรา

เชื้อราเอนโดไฟต์	สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา เฉลี่ยอัตราการตาย (ร้อยละ)					สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา เฉลี่ยอัตราการตาย (ร้อยละ)				
	500	**400**	**300**	**200**	**100**	**500**	**400**	**300**	**200**	**100**
ยุงลายบ้าน										
Arcopilus cupreus	15	13	8	0	0	100	87	80	77	77
Endomelanconiopsis endophytica	0	0	0	0	0	100	54	42	39	13
Nemania primolutea	100	97	95	95	80	23	0	0	0	0
Penicillium citrinum	0	0	0	0	0	95	92	78	56	52
Trichoderma reesei	8	3	0	0	0	78	75	70	68	64
Positive control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ยุงลายสวน										
Colletotrichum sp.	0	0	0	0	0	70	25	0	0	0
Endomelanconiopsis endophytica	100	95	74	70	6	100	38	0	0	0
Fusarium decemcellulare	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium sp.	0	0	0	0	0	84	32	0	0	0
Neodeightonia phoenicum	0	0	0	0	0	94	85	82	81	73
Neopestalotiopsis sp.	100	100	100	99	92	0	0	0	0	0
Nodulisporium sp.	74	71	44	34	34	0	0	0	0	0
Penicillium steckii	0	0	0	0	0	100	46	0	0	0
Phyllosticta capitalensis	0	0	0	0	0	100	80	73	63	34
Pseudopithomyces maydicus	0	0	0	0	0	100	48	0	0	0
Talaromyces aurantiacus	0	0	0	0	0	76	64	52	44	40
Positive control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Negative control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

อภิปรายผล

สารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *Nemania primolutea* ที่แยกได้จากต้นปาล์มมีประสิทธิภาพสูงสุดในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านที่ความเข้มข้นต่ำสุด 100 ppm โดยสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ ร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกัน จากการศึกษาของ Pandia M และคณะ พบว่าสารสกัดของเชื้อราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis uvicola* และ *Botryodiplodia theobromae* สามารถฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญได้หลังจากสัมผัสสารสกัดที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200-400 ppm[10] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นปาล์มไต้หวันในประเทศซาอุดิอาระเบียที่ความเข้มข้น 300 ppm สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลาย *Aedes caspius* และลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex pipiens* ได้[9] เช่นเดียวกับสารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์และรา Basidiomycete ต่อลูกน้ำของยุงก้นปล่องและลูกน้ำยุงลาย พบว่าสารสกัดเชื้อราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis virgulata* สามารถยับยั้งลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis virgulata* และ *Pycnoporus sanguineus* มีประสิทธิภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อลูกน้ำยุงที่ก่อให้เกิดโรคในเขตร้อน[5] เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้กับงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว พบว่ามีเชื้อราบางสายพันธุ์ที่เคยมีการศึกษาในต่างประเทศและนำมาทดสอบกับลูกน้ำยุงแล้วมีผลในการฆ่าลูกน้ำได้ คือ *Aspergillus spp.* และ *Fusarium spp.* จากใบของต้นคนทีเขมาที่เก็บในประเทศอินเดีย สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ร้อยละ 90.47 และ 85.72 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 20 ppm โดยการสัมผัสลูกน้ำอย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในการกำจัดลูกน้ำยุง[11] จากการศึกษาของ Majumder D.R. ที่ทำการทดสอบ *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* และ *Trichoderma spp.* ซึ่งเป็นเชื้อราทางการแพทย์ที่สามารถต้านเชื้อราทางการเกษตรได้ดี พบว่าเมื่อนำมาทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญสามารถฆ่าลูกน้ำได้ที่ 24 – 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10 สปอร์/มิลลิลิตร[7] จากงานวิจัยดังกล่าวเพียงพอเป็นข้อมูลพื้นฐานว่าเชื้อราบางส่วนที่มีการศึกษาในต่างประเทศสอดคล้องกับเชื้อรากลุ่มที่แยกได้จากการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ *Fusarium* spp มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าความเข้มข้นของสารสกัด 400-500 ppm เชื้อรา *Penicillium citrinum* และ *Fusarium* sp. สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวนได้ร้อยละ 95 และ 84 ตามลำดับ เชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *Nemania primolutea* และ*Arcopilus cupreus* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้าน และ *Neopestalotiopsis* sp. *Neodeightonia phoenicum* มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าลูกน้ำยุงลายสวนที่ความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบ 100 ppm

สรุปผล

การวิจัยครั้งนี้สามารถจำแนกเชื้อราที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายบ้านได้ดี คือเชื้อรา *Nemania primolutea, Arcopilus cupreus* ที่แยกจากต้นปาล์มและต้นมังคุด พบอัตราการตายลูกน้ำยุงลายบ้านร้อยละ 80 และ 77 ตามลำดับ ส่วน *Neopestalotiopsis sp.* และ *Neodeightonia phoenicum* ที่แยกจากสวนปาล์มและสวนยาง พบอัตราการตายลูกน้ำยุงลายสวนร้อยละ 92 และ 73 ตามลำดับ รวมทั้งเนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟต์เหล่านี้ไม่ได้เป็นเชื้อราก่อโรคในคน[7] จึงเป็นโอกาสในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงได้

ข้อจำกัดของการวิจัย

การวิจัยนี้มีเวลาดำเนินการวิจัยค่อนข้างน้อยจากขั้นตอนการพิจารณาจัดสรรงบประมาณทำให้ต้องวางแผนดำเนินการวิจัยตามข้อจำกัดของเวลา

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

เชื้อราเอนโดไฟต์เหล่านี้มีความจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนขององค์ประกอบของสารสกัดหยาบและนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายอีกครั้ง รวมทั้งการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในระบบย่อยอาหารของลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายสวน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมวิจัยแห่งชาติและกองนวัตกรรมและวิจัย กรมควบคุมโรค ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรคที่สนับสนุนบุคลากรในการวิจัย ขอขอบคุณ ดร.สุรชาติ โกยดุลย์ และเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยและนวัตกรรม ที่ให้คำปรึกษาในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณนายบรรยง นันทโรจนาพร กรรมการผู้จัดการบริษัทโปรไบโอติกและเฮอร์บัลที่ให้สถานที่ในการดำเนินการวิจัย รวมทั้งศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์แยกชนิดเชื้อรา และคำแนะนำในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

1. ขนิษฐา ปานแก้ว, บุษราคัม สินาคม, พรพิมล ประดิษฐ์, บุญเสริม อ่วมอ่อง. การศึกษาความไวต่อสารเคมีและสารเสริมฤทธิ์ของยุงลาย Aedes aegypti ประเทศไทย ปี พ.ศ.2562. วารสารวิชาการป้องกันควบคุมโรค สคร.2 พิษณุโลก 2564; 8(1): 69-83.
2. วรรณฤดี หิรัญรัตน์. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 2552; 12(2): 90 – 100.
3. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. J Am Mosq Control Assoc 1987; 3(2): 302-3. PMID: 3333059.
4. Attitalla IH. Modified CTAB method for high quality genomic DNA extraction from medicinal Plants. Pak J Biol Sci 2011; 14(21): 998-9. PMID: 22514891.
5. Bücker A, Bücker NC, Souza AQ, Gama AM, Rodrigues-Filho E, Costa FM, et al. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46(4): 411-9. doi: https://doi.org/10.1590/0037-8682-0063-2013.
6. Bacon CW, White JF. An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. New York: Boca Raton Publishers; 2000. p.28.
7. Majumder DR. Eradication of mosquito borne disease by entomopathogenic fungi. World J Pharm Res 2017; 6(8): 1420-50. doi: 10.20959/wjpr20178-9002.
8. Katoch M, Singh G, Sharma S, Gupta N, Sangwan PL, Saxena AK. Cytotoxic and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from Bacopa monnieri (L.) Pennell (Scrophulariaceae). BMC Complement Altern Med 2014; 14: 52. doi: 10.1186/1472-6882-14-52.
9. Abutaha N, Mashaly AMA, Al-Mekhlafi FA, Farooq M, Al-shami M, Wadaan MA. Larvicidal activity of endophytic fungal extract of *Cochliobolus spicifer* (Pleosporales: Pleosporaceae) on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culidae). Entomo-Zoo 2015; 50(3): 405-14. doi: https://doi.org/10.1007/s13355-015-0347-6.
10. Sathiyanathan M, Umarajan KM. Larvicidal activity of endophytic fungi isolated from selected medicinal plants on *Aedes aegypti.* J Pharmacogn Phytochem 2019; 8(2): 247-53.
11. Solarte F, Muñoz CG, Maharachchikumbura SSN, Álvarez E. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis spp.*, causal agents of guava scab in Colombia. Plant Dis 2018; 102(1): 49-59. doi: 10.1094/PDIS-01-17-0068-RE.