ไมคอไวรัส: การประยุกต์ใช้ด้านการเกษตร อุตสาหกรรม และการแพทย์
Mycovirus: agricultural, industrial and medical applications

ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
Thanyanuch Kriangkripipat
Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Received: 3 June 2019/ Revised: 18 July 2019/ Accepted: 7 August 2019

บทคัดย่อ

ไมคอไวรัส (mycovirus) คือ ไวรัสที่อาศัยอยู่ในราซึ่งพบในราไฟลัมต่าง ๆ ไมคอไวรัสส่วนใหญ่มีจีโนมชนิดอาร์เอ็นเอและติดต่อผ่านการรวมสายใยและสร้างสปอร์ ทั้งนี้การศึกษาไมคอไวรัสมีน้อยเมื่อเทียบกับไวรัสในพืชและสัตว์ และพบว่าราที่ติดไวรัสส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ อย่างไรก็ตามมีการพัฒนาวิธีการคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอไวรัสที่รวดเร็วขึ้น ส่งผลให้จำนวนไมคอไวรัสในฐานข้อมูลเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ไมคอไวรัสบางชนิดทำให้รามีความรุนแรงในการก่อโรคลดลงหรือเพิ่มขึ้น ไมคอไวรัสบางชนิดเพิ่มความสามารถในการแข่งขันและอยู่รอดในธรรมชาติของราเจ้าบ้าน ไมคอไวรัสที่ลดความรุนแรงในการก่อโรคของราที่ก่อโรคในพืชและสัตว์สามารถพัฒนาเป็นจุลินทรีย์ควบคุมทางชีวภาพ ส่วนไมคอไวรัสที่เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคจะก่อให้เกิดผลเสียทางการเกษตรและการรักษาโรคติดเชื้อรา คิลเลอร์ทอกซินสร้างโดยไมคอไวรัสในยีสต์ใช้ป้องกันการปนเปื้อนจากยีสต์ที่ไม่ต้องการในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ราที่ถูกจัดอนุกรมวิธานแล้วมีประมาณ 120,000 สปีชีส์แต่มีการค้นพบไมคอไวรัสประมาณ 300 สปีชีส์ ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของราสูง แต่การศึกษาไมคอไวรัสในประเทศไทยมีน้อยมาก ในบทความนี้จะกล่าวถึงความหลากหลายของไมคอไวรัส วิธีการคัดแยก และระบุชนิดและการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ

คำสำคัญ: ไมคอไวรัส ความหลากหลาย การควบคุมโดยชีววิธี อุตสาหกรรม ทางการแพทย์

Corresponding author: Thanyanuch.k@chula.ac.th

Abstract

Mycovirus is the virus that infects fungi and has been commonly found in many taxonomic groups of fungi. Most mycoviruses have RNA genomes and are transmitted intracellularly through hyphal anastomosis or spores. Study of mycovirus lacks behind those in plant and animal viruses. In most cases mycovirus infections are symptomless. Recently developed methods for the rapid extraction and sequencing of dsRNAs aids in steadily deposition of novel mycovirus to the data base. Not many mycovirus reported so far cause hypovirulence or hypervirulence. Certain mycoviruses increase survival and fitness of their fungal hosts. Mycoviruses associated with hypovirulence of plant and animal pathogens are potential biological control agents. Mycoviruses with hypervirulent effect on pathogenicity are negatively affect agricultural production and treatment of mycosis. Yeast killer toxins produced by mycoviruses have found several applications in food production and alcoholic beverage. There are 120,000 currently accepted fungal species; however, only approximately 300 species of mycovirus have been reported. Thailand is rich in fungal biodiversity but few studies of mycovirus have been reported. This review explores biodiversity, isolation and characterization methods and application of mycovirus.

Keywords: Mycovirus, Diversity, Biocontrol, Industry, Medical

บทนำ

ไมคอไวรัส (mycovirus) คือ ไวรัสที่อาศัยอยู่ในรา หรือไวรัสที่มีการเพิ่มจำนวนในรา การศึกษาเกี่ยวกับไมคอไวรัสเกิดขึ้นไม่นานมานี้เมื่อเทียบกับการศึกษาไวรัสในสัตว์และพืช ไมคอไวรัสถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในเรือนเพาะเลี้ยงเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) ของพี่น้องตระกูล La France จึงถูกเรียกว่าโรคลาฟรานซ (La France disease) [1] อาการของโรคคือสายใยไม่เจริญ ดอกเห็ดมีขนาดและรูปร่างผิดปกติ ดอกเห็ดมีสีน้ำตาลและผลผลิตลดลง ต่อมามีการค้นพบไมคอไวรัส *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) ที่สามารถลดความรุนแรงในการก่อโรคของราเจ้าบ้านจึงนำไวรัสมาใช้ในการควบคุมโรคและประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวางในทวีปยุโรป เจ้าบ้านของ CHV1 คือ รา *Cryphonectria parasitica* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแคงเคอร์ (cankers) ทำให้ต้นเกาลัด (chestnut) ในป่าทวีปยุโรปและทวีปอเมริกายืนต้นตายเป็นจำนวนมากส่งผลเสียต่อระบบนิเวศวิทยาอย่างรุนแรง [2] การศึกษาไมคอไวรัสที่สามารถลดความรุนแรงในการก่อโรคของราก่อโรคพืชได้รับความสนใจมากที่สุดเนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการโรคพืช ไมคอไวรัสส่วนใหญ่ไม่มีผลกระทบกับการเจริญหรือไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา (asymptomatic หรือ cryptic) ในขณะที่ไมคอไวรัสบางชนิดลดความรุนแรงในการก่อโรค (hypovirulent) และบางชนิดเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค (hypervirulent) หรือทำให้ราเจ้าบ้านสามารถสร้างคิลเลอร์ทอกซิน (killer toxin) [3, 4] วงชีวิตของไมคอไวรัสอยู่ภายในสายใยหรือเซลล์ของเจ้าบ้าน การแพร่ของไมคอไวรัสตามธรรมชาติผ่าน 2 ช่องทางคือ การแพร่ในแนวราบ (horizontal transfer) ด้วยการรวมกันของสายใยหรือเซลล์ (anastomosis) และการแพร่ในแนวดิ่ง (vertical transmission) ด้วยการแฝงไปในสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ หรือถ่ายทอดด้วยวิธีในห้องปฏิบัติการ เช่น การรวมโปรโตพลาสต์ [3] การถ่ายทอดทางวิธีกล (mechanical transmission) โดยการสัมผัสระหว่าง วิริออนกับสายใยมีรายงานในไมคอไวรัสเพียงชนิดเดียว [5] ไมคอไวรัสส่วนใหญ่มีจีโนมชนิดอาร์เอ็นเอส่วน

ไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิดดีเอ็นเอพบเพียงชนิดเดียว [5] การศึกษาไมคอไวรัสมีน้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาไวรัสในสัตว์ พืช และแบคทีเรีย ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบไมคอไวรัสมากกว่า 300 ชนิด พร้อมทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และระบุชนิดของไมคอไวรัสจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ไมคอไวรัสพบในราไฟลัม Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota และ Basidiomycota ในสิ่งมีชีวิตคล้ายรา เช่น ราน้ำและราเมือก [6, 7] บทความนี้จะกล่าวถึงความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายของไมคอไวรัส วิธีการคัดแยก อนุกรมวิธาน สมมติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการและบทบาทและการประยุกต์ใช้ไมคอไวรัสในด้านการเกษตร อุตสาหกรรม และการแพทย์

ความหลากหลายและอนุกรมวิธานของไมคอไวรัส

สารพันธุกรรมของไมคอไวรัสมีทั้งชนิดที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอทั้งแบบสายเดี่ยวและสายคู่ ส่วนใหญ่จะมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) มีเพียง 1 ใน 3 เท่านั้น ที่พบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) [8] และพบเพียง 1 ชนิดที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบวงกลม (circular ssDNA) [5] ส่วนไมคอไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ยังไม่มีรายงานการค้นพบ ไมคอไวรัสอาจพบเป็นอนุภาคคล้ายไวรัส (virus-like particles) แบบที่มีโปรตีนห่อหุ้มหรือแคปซิด (capsid protein) รูปทรงรูปหลายเหลี่ยมสมมาตร (icosahedral หรือ isometric) หรือรูปร่างคล้ายเส้นด้าย (filament) หรือแบบที่มีเพียงสารพันธุกรรม (capsidless) จีโนมของไมคอไวรัสพบเป็นสารพันธุกรรมชิ้นเดียว (monopartite) หรือสารพันธุกรรมหลายชิ้น (multipartite) การจัดอนุกรมวิธานของไมคอไวรัสอ้างอิงตาม International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) [8] แบ่งเป็น 18 วงศ์ และ 1 จีนัส จำแนกไมคอไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้น 9 วงศ์ แบ่งเป็นไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบสายบวก (positive, single-stranded RNA genome) (+ssRNA) 7 วงศ์ ได้แก่ *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Botourmiaviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Endornaviridae*, *Hypoviridae* และ *Narnaviridae* ไมคอไวรัส +ssRNA ชนิดรีโทรไวรัส (retrovirus) 2 วงศ์ คือ *Metaviridae* และ *Pseudoviridae* ไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบสายลบ (negative, single-stranded RNA genome) (-ssRNA) 1 วงศ์ ได้แก่ *Mymonaviridae* ไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA genome) (dsRNA) 7 วงศ์ ได้แก่ *Amalgaviridae*, *Chrysoviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadriviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae* และ *Totiviridae* ไมคอไวรัสชนิด dsRNA ที่ยังไม่ระบุวงศ์ 1 จีนัส คือ *Botybirnavirus* ส่วนไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบวง (circular ssDNA) พบเพียงชนิดเดียวจัดอยู่ในวงศ์ *Genomoviridae* นอกจากนี้ยังมีไมคอไวรัสหลายชนิดที่ยังไม่ถูกรับรองอย่างเป็นทางการโดย ICTV เช่น Botrytis cinerea negative-stranded RNA virus 1 ซึ่งมี RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ใกล้เคียงกับไวรัสในพืชจีนัส *Emaravirus* และไวรัสในสัตว์ในชั้น *Bunyavirales* [9] การศึกษาไมคอไวรัสในประเทศไทยมีน้อยมากมีเพียงรายงานการพบ dsRNA ไมคอไวรัสในรา *Trichoderma* spp. โดย Jom-in และ Akarapisan [10] และบุณยฤทธิ์ [11] ไมคอไวรัสชนิดใหม่ที่ถูกรายงานมากขึ้นจะช่วยให้เห็นภาพรวมของวิวัฒนาการและการจัดความหลากหลายของไมคอไวรัสในอนุกรมวิธานมีความถูกต้องมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น Soybean leaf-associated mycoflexivirus 1 (SlaMFV1) ถูกจัดจำแนกในวงศ์ *Gammaflexiviridae* ต่อมาภายหลังมีการค้นพบไมคอไวรัสที่มีความคล้ายคลึงกับ SlaMFV1 เพิ่มขึ้นอีก 2 ชนิด เมื่อนำไวรัสทั้ง 3 ชนิด มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ร่วมกับไวรัสชนิดอื่น ๆ ในวงศ์ *Gammaflexiviridae* พบว่า ไวรัสทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างจากสมาชิกอื่น ๆ จึงได้กำหนดวงศ์ใหม่เป็น *Deltaflexiviridae* และตั้งชื่อสปีชีส์ให้ SlaMFV1 ว่า *Soybean-associated deltaflexivirus 1* [8]

การคัดแยกและการระบุชนิดไมคอไวรัส

ราที่แสดงลักษณะเปลี่ยนไปจากปกติ เช่น การสร้างรงควัตถุ ลักษณะของสายใย อัตราการเจริญ ความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศลดลง และความสามารถในการก่อโรครุนแรงขึ้นหรือต่ำลง เป็นต้น เป็นลักษณะที่อาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสและมักเป็นเหตุจูงใจให้ตรวจหาไวรัส อย่างไรก็ตามไมคอไวรัสส่วนใหญ่ไม่ทำให้เจ้าบ้านเกิดลักษณะผิดปกติ ใด ๆ การคัดแยกไมคอไวรัสมักใช้วิธีตรวจหาจากตัวอย่างราที่รวบรวมไว้ทีละไอโซเลท โอกาสพบไมคอไวรัสจากตัวอย่างราแตกต่างกันไปตามสปีชีส์และภูมิภาค Voth และคณะ [12] คัดแยก *Ustilago maydis virus H1* (Umv-H1) จาก *Ustilago maydis* ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบไวรัส 34.2เปอร์เซ็นต์ (66/232 ไอโซเลท) แต่ *U. maydis* จากประเทศเม็กซิโกจำนวน 44 ไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทติดเชื้อ Umv-H1 ในขณะที่ van Diepeningen และคณะ [13] พบ dsRNA ไวรัสใน *Aspergillus* section Nigri เพียง 64 ไอโซเลท จากทั้งหมด 668 ไอโซเลท (10 เปอร์เซ็นต์) การคัดแยกไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิด DNA ทำได้ง่ายโดยการสกัดสารพันธุกรรมทั้งหมดนำมาย่อยด้วย RNase A เพื่อกำจัด ssRNA และ dsRNA จากนั้นนำมาแยกบนอะกาโรสเจลเพื่อหาแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างจากจีโนมของรา [5] ส่วนไมคอไวรัสชนิดรีโทรไวรัสจะตรวจพบจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมราเจ้าบ้านเนื่องจากไวรัสชนิดนี้จะแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของเจ้าบ้าน [14]

การคัดแยกและการระบุชนิดไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิด ssRNA และ dsRNA ใช้วิธีเดียวกันเนื่องจากสารพันธุกรรมของไมคอไวรัสที่มีจีโนมชนิด ssRNA จะอยู่ในรูป dsRNA ขณะจำลองตัวเอง (replicative form) การสกัด dsRNA ให้บริสุทธิ์ใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Morris และ Dodds [15] อาศัยหลักการที่ dsRNA จับกับผงเซลลูโลสในบัฟเฟอร์ที่มีเอทานอล เนื่องจากบริษัทผู้ผลิตยกเลิกการผลิตผงเซลลูโลส CF 11 (Whatman, UK) จึงมีรายงานการใช้ผงเซลลูโลสจากผู้ผลิตอื่นทดแทน เช่น C6288 (Sigma-Aldrich, MO, USA) [16] cellulose A และ D (Advantec, Tokyo, Japan) [17] เมื่อนำ dsRNAs มาแยกบนอะกาโรสเจลแถบที่ปรากฏจะมีขนาดใหญ่กว่าจริงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับขนาดของ dsDNA มาตรฐาน จากนั้นจึงยืนยันอีกครั้งด้วยการทดสอบกับนิวคลีเอส dsRNA จะทนการย่อยด้วย RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีเกลือสูง (โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์) แต่ถูกย่อยด้วย RNase A ในบัฟเฟอร์ที่มีเกลือต่ำ (โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-100 มิลลิโมลาร์) [18] อย่างไร ก็ตามจำนวนแถบ dsRNA ของไมคอไวรัสที่พบบนอะกาโรสเจลไม่สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของไวรัสเนื่องจากจีโนมของไมคอไวรัสมีจำนวนชิ้นของสารพันธุกรรมตั้งแต่ 1 ถึง 12 ชิ้น เช่น ไมคอไวรัสในวงศ์ *Reoviridae* มีจีโนม 12 ชิ้น ไมคอไวรัสในวงศ์ *Chrysoviridae* มีจีโนม 3-7 ชิ้น [8] และมีรายงานว่าราสามารถติดไมคอไวรัสพร้อมกันได้มากกว่า 1 ชนิด [19] ไมคอไวรัส บางชนิดมีแซทเทลไลท์ (satellite) ซึ่งเป็นชิ้นสารพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนโดยอาศัยเอนไซม์และแคปซิดจากไวรัสผู้ช่วย (helper virus) [20]

นอกจากนี้ RdRp และแคปซิดของไวรัสในจีนัสและวงศ์ต่างกันมีความหลากหลายในระดับนิวคลีโอไทด์สูงจึงไม่สามารถสร้างไพร์เมอร์จำเพาะ [21, 22] การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA ไมคอไวรัสทำได้โดยการสร้างซีดีเอ็นเอ (complementary DNA, cDNA) ด้วยไพรเมอร์ชนิดที่ไม่จำเพาะ (random primer) ออกแบบโดย Froussard [23] ส่วนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3’ และ 5’ จะใช้วิธี RLM-RACE คิดค้นโดย Coutts และ Livieratos [24] จากนั้นโคลนชิ้นดีเอ็นเอลงในพลาสมิดเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทีละโคลน หรือวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Deep sequencing [19] จำนวนชนิดของไมคอไวรัสในราแต่ละไอโซเลทสามารถระบุได้จากจำนวนยีน RdRp เพราะไมคอไวรัสแต่ละชนิดจะมียีนนี้เพียงยีนเดียว การตรวจสอบชนิดจีโนมของไมคอไวรัสว่าเป็น dsRNA หรือ ssRNA ทำได้โดยการตรวจสอบสารพันธุกรรมจากวิริออนบริสุทธิ์ หรือในกรณีที่ไมคอไวรัสไม่มีแคปซิดสามารถใช้เทคนิคตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) ด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับ RNA แต่ละสาย [25]

สมมติฐานกำเนิดและวิวัฒนาการของไมคอไวรัส

สมมติฐานเกี่ยวกับกำเนิดและวิวัฒนาการของไมคอไวรัสมี 2 สมมติฐาน คือ สมมติฐานวิวัฒนาการร่วมกันระหว่างไวรัสและรามีมาแต่ดึกดำบรรพ์ (ancient coevolution hypothesis) และสมมติฐานไมคอไวรัสมาจากไวรัสในพืช (plant virus hypothesis) [3] สมมติฐานวิวัฒนาการร่วมกันระหว่างไวรัสและรามีมาแต่ดึกดำบรรพ์ กล่าวว่า ไม่ทราบที่มาของไมคอไวรัสแต่ ไมคอไวรัสกับรามีวิวัฒนาการร่วมกันมานาน การติดเชื้อไมคอไวรัสส่วนใหญ่ผ่านทางการเชื่อมกันของสายใยและการส่งผ่านไมคอไวรัสทางสปอร์ซึ่งแตกต่างจากไวรัสในสิ่งมีชีวิตอาณาจักรอื่น ๆ ที่วิริออนก่อการติดเชื้อทางวิธีกล ไมคอไวรัสส่วนใหญ่ไม่มีพาหะซึ่งต่างจากไวรัสในพืชและสัตว์ [26] ไมคอไวรัสบางวงศ์อาจมีมาแต่บรรพบุรุษของเซลล์ที่มีนิวเคลียส เช่น ไวรัสในวงศ์ *Reoviridae* มีเจ้าบ้านเป็นโปรโตซัว รา พืช และสัตว์ แต่ไมคอไวรัสของวงศ์นี้ถูกจัดอยู่ในจีนัส *Mycoreovirus* เท่านั้น [27] *Cryphonectria mitovirus 1* ซึ่งเพิ่มจำนวนในไมโตคอนเดรียของรา *Cryphonectria parasitica* แสดงถึงการวิวัฒนาการร่วมกันมายาวนานของไมคอไวรัสกับราเจ้าบ้านเพราะไมคอไวรัสชนิดนี้ใช้โคดอนของไมโตคอนเดรีย [28]

นอกจากนี้ไมคอไวรัสส่วนใหญ่ไม่ทำให้ราเจ้าบ้านเกิดความผิดปกติแสดงถึงการปรับตัวของไวรัสเพื่อพึ่งพาอาศัยเจ้าบ้าน [3] สมมติฐานว่าไมคอไวรัสมาจากไวรัสในพืชมีเหตุผลสนับสนุนจากไมคอไวรัสหลายชนิดมีความใกล้เคียงทางวิวัฒนาการกับไวรัสในพืช ความสัมพันธ์ของพืชและราในระบบนิเวศวิทยามีความใกล้ชิดกันมาก เช่น พืชกับรา ก่อโรคพืชและพืชกับราเอนโดไฟต์ สมาชิกในจีนัส *Alphapartitivirus* และจีนัส *Betapartitivirus* ในวงศ์ *Partitiviridae* ประกอบด้วยไมคอไวรัสและไวรัสในพืช [29] รา *Botrytis* spp. ก่อโรคในพืชจีนัส *Allium* เช่น กระเทียมและหอม *Botrytis virus X* (BVX) และ *Garlic virus A* (GVA) เป็นสมาชิกในวงศ์ *Alphaflexiviridae* ไมคอไวรัส BVX อยู่ในจีนัส *Botrexvirus* มีลำดับกรดอะมิโนของจีโนมคล้ายคลึงกับไวรัสในพืช GVA ซึ่งอยู่ในจีนัส *Allexivirus* สูงถึง 73% ซึ่งสูงกว่าความคล้ายคลึงของจีโนมไมคอไวรัสและไวรัสในพืชที่เคยมีรายงาน แต่ไมคอไวรัสในจีนัส *Botrexvirus* ไม่มีแคปซิดและ movement protein ซึ่งจำเป็นในการถ่ายทอดทางวิธีกล แสดงให้เห็นว่าราอาจได้รับไวรัสมาจากพืชและไวรัสปรับตัวให้เข้ากับวงชีวิตของรา [30] นอกจากนี้วงศ์ *Alphaflexiviridae* มี 7 จีนัส สมาชิกใน 5 จีนัสล้วนเป็นไวรัสในพืชมีเพียงไมคอไวรัสของราก่อโรคพืชเพียง 2 จีนัส ๆ ละ 1 ชนิด [8] ไมคอไวรัส *Sclerotinia gemycircularvirus 1* หรือ Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence associated DNA virus 1 (SsHADV-1) คัดแยกจากราก่อโรคพืช *Sclerotinia sclerotiorum* มีความคล้ายคลึงกับไวรัสพืชในวงศ์ *Geminiviridae* [5] อย่างไรก็ตามความคล้ายคลึงระหว่าง ไมคอไวรัสและไวรัสในพืชอาจเกิดจากพืชได้รับไวรัสจากรา มีรายงานว่าไมคอไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์พืช [31] และไวรัสในพืชสามารถเพิ่มจำนวนในสายใยรา [32]

บทบาทของไมคอไวรัสและการประยุกต์ใช้ไมคอไวรัสในด้านการเกษตร

ไมคอไวรัสที่ลดความรุนแรงของราก่อโรคพืชเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากอาจนำไปพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมศัตรูพืช ด้วยเหตุนี้จึงมีการค้นหาและรายงานไมคอไวรัสในราก่อโรคพืชมากที่สุด ไมคอไวรัส CHV1 จากรา *C. parasitica* เป็นไมคอไวรัสชนิดแรกที่ใช้ในการควบคุมโรคในต้นเกาลัด [2] อย่างไรก็ตามไมคอไวรัสส่วนใหญ่รวมถึง CHV1 แพร่กระจายผ่านการรวมกันของสายใย ยีน *vic* (vegetative incompatibility) ที่ควบคุมการเข้ากันได้ของสายใยจึงเป็นอุปสรรคหนึ่งในการควบคุมราก่อโรคพืชด้วยไมคอไวรัส รา *C. parasitica* มียีน *vic* ทั้งหมด 7 อัลลีล จึงมีการดัดแปลงพันธุกรรมของ *C. parasitica* ให้มีความเข้ากันได้กับยีน *vic* ทุกกลุ่มเพื่อใช้เป็นพาหะในการแพร่ CHV1 [33] Yu และคณะ [34] ใช้ไมคอไวรัส SsHADV-1 ควบคุมรา *S. sclerotiorum* ซึ่งก่อโรคในต้นผักกาดก้านขาว (rapeseed) พบว่าการทดลองในแปลงเพาะปลูกได้ผลดีเทียบเท่ากับการ

ใช้สารเคมี วิริออนที่พ่นบนใบพืชในแปลงทดลองสามารถก่อการติดเชื้อในราได้ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่ไม่พบในไมคอไวรัสชนิดอื่น นอกจากนี้ SsHADV-1 สามารถเพิ่มจำนวนในแมลงกินราและใช้แมลงเป็นพาหะในการแพร่ ไมคอไวรัส อย่างไรก็ตาม SsHADV-1 ก่อการติดเชื้อเฉพาะจีนัส *Sclerotinia* เท่านั้น จึงเป็นข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้เพราะพืชมักมีราก่อโรคหลายชนิด [26] มีการใช้รา *Beauveria bassiana* ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง *B. bassiana* ที่มี ไมคอไวรัสทำให้หนอนตัวอ่อนของผีเสื้อกลางคืน (*Galleria mellonella*) ตายเร็วขึ้น เมื่อเทียบกับราที่ไม่มีไวรัส [25] จึงมีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพราในการควบคุมแมลงศัตรูพืช นอกจากปัญหาโรคพืชเกษตรกรยังประสบปัญหาภัยแล้งอยู่เสมอ การใช้ไมคอไวรัสช่วยให้พืชสามารถทนแล้งได้มากขึ้นอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืช มีการคัดแยก Curvularia thermal tolerance virus (CThTV) ในรา *Curvularia protuberate* ทำให้หญ้า (*Dichanthelium lanuginosum*) ทนอุณหภูมิสูง ทนความแห้งแล้งและเจริญเติบโตได้เร็วกว่าต้นหญ้าที่ไม่มีราและไวรัส [35] การทดลองติดเชื้อ CThTV ในราเอนโดไฟต์ของพืชเศรษฐกิจชนิดต่าง ๆ นับเป็นแนวคิดที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามไวรัสที่เพิ่มความสามารถในการแข่งขันของราก่อโรคพืชจะทำให้เกิดความเสียหายต่อพืชรุนแรงขึ้น เช่น *Phytophthora infestans* RNA virus 2 ทำให้ *Phytophthora infestans* สร้างสปอร์แรงเจียมมากกว่าปกติจึงเป็นปัจจัยส่งเสริมการระบาดของโรค [6] และมีรายงานว่าราก่อโรคพืช *Nectria radicicola* ที่มี dsRNA ไมคอไวรัสเพิ่มความ รุนแรงในการก่อโรค [36]

บทบาทของไมคอไวรัสและการประยุกต์ใช้ไมคอไวรัสในด้านอุตสาหกรรม

ยีสต์ที่สร้างคิลเลอร์ทอกซิน (killer toxin) เรียกว่าคิลเลอร์ยีสต์ (killer yeast หรือ mycocinogenic yeast) คิลเลอร์ทอกซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถฆ่ายีสต์ชนิดอื่น พบครั้งแรกใน *Saccharomyces cerevisiae* มี 4 ชนิดคือ K1, K2, K28 และ Klus [20] ยีนประมวลรหัสสำหรับโปรตีน K อยู่บน M-dsRNA ซึ่งเป็นแซทเทลไลท์ของ *S. cerevisiae virus L-A* [4] กลไกการฆ่าเซลล์ของคิลเลอร์ทอกซินแต่ละชนิดแตกต่างกัน K1 และ K2 สร้างช่องไอออนบนเยื่อหุ้มเซลล์ K28 ขัดขวางกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ ส่วนกลไกฆ่าเซลล์ของ Klus ยังไม่มีการศึกษา [20] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ชนิดอื่นในวงศ์ Saccharomycetaceae มีความไวต่อคิลเลอร์ทอกซิน เช่น *Hanseniaspora* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefir* และ *C. tropicalis* [20] killer yeast พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติและพบปนเปื้อนในอุตสาหกรรมหมักไวน์ ในธรรมชาติ *S. cerevisiae* จะมี M-dsRNA ได้เพียงชนิดเดียว จึงมีการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ให้สร้าง K2 และ K28 จาก cDNA บนเวคเตอร์ 2μ และสร้าง K1 จาก dsRNA ไวรัส เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากยีสต์อื่น [37] ในปี 2017 มีรายงานพบ คิลเลอร์ทอกซินใหม่ 4 ชนิด ใน *S. paradoxus* และแสดงให้เห็นว่าไมคอไวรัสจาก *S. paradoxus* สามารถเพิ่มจำนวนและสร้างคิลเลอร์ทอกซินใน *S. cerevisiae*, *S. uvarum* และ *S. kudriavzevii* [38] สาร zygocin สร้างโดย *Z. bailii* virus M ในยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* และสาร victoriocin สร้างโดย dsRNA ไมคอไวรัสในรา *Helminthosporium victoriae* มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์แตกหน่อ ยีสต์แบ่งตัว และราสายใยหลายชนิด [39, 40] แสดงให้เห็นว่าคิลเลอร์ทอกซินสามารถพัฒนามาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งยีสต์และราที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ [41] อย่างไรก็ตามไมคอไวรัสอาจก่อให้เกิดผลเสียในด้านอุตสาหกรรม เช่น มีการรายงานพบ *Penicillium chrysogenum virus* (PcV) ในรา *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน โปรตีนที่ประมวลรหัสโดย dsRNA3 และ 4 ของ PcV เป็นโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่และไม่คล้ายคลึงกับโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูล NCBI แม้ว่าไวรัสไม่เปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์และการเจริญของราแต่ไวรัสอาจมีผลกระทบต่อปริมาณเพนนิซิลิน [42] ดังนั้นควรตรวจสอบไมคอไวรัสในราที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อรักษาเสถียรภาพของสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต

บทบาทของไมคอไวรัสและการประยุกต์ใช้ไมคอไวรัสในด้านการแพทย์

การดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ก่อโรคในคนและสัตว์และความต้องการยาปฏิชีวนะชนิดใหม่เป็นปัญหาสำคัญ มีการทดลองใช้แบคเทอริโอเฟจในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี [43] แต่ไมคอไวรัสส่วนใหญ่ไม่มีการถ่ายทอดทางวิธีกลจึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำไมคอไวรัสมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรค อย่างไรก็ตาม SsHADV-1 เป็นไมคอไวรัสชนิดเดียวที่สามารถถ่ายทอดทางวิธีกล การค้นพบ ssDNA ไมคอไวรัสที่มีความคล้ายคลึงกับ SsHADV-1 ในเมตาจีโนม (metagenome) จากสัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม [44] เป็นความหวังว่าในอนาคตอาจค้นพบ ไมคอไวรัสที่จะนำมาใช้ประโยชน์ได้ในด้านการแพทย์ คิลเลอร์ทอกซินซึ่งสร้างจากไมคอไวรัสถูกค้นพบนานแล้วและคิลเลอร์ ทอกซินจากยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราสายใยก่อโรคได้หลายชนิด แต่การพัฒนาใช้คิลเลอร์ทอกซินจากยีสต์ในการรักษาโรคติดเชื้อยีสต์และรายังไม่ประสบความสำเร็จ อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของโปรตีนทอกซินอยู่ในช่วง pH 4 ถึง 5.8 และอุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส และเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส [20, 45] ไมคอไวรัสที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงขึ้นจะเป็นอุปสรรคในการรักษาโรคติดเชื้อราในผู้ป่วย เช่น *Talaromyces marneffei partitivirus*-1 (TmPV1) ในรา *Talaromyces marneffei* ทำให้หนูในชุดทดลองตายเร็วกว่าชุดควบคุมและทำให้มีปริมาณเชื้อราในอวัยวะภายในสูงกว่าชุดควบคุม เมื่อศึกษาในระดับอณูชีววิทยา Lau และคณะ พบว่า TmPV1 ชักนำให้ราแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคสูงกว่าสายพันธุ์ที่ปราศจากไวรัสและกดการแสดงออกของ RNA interference (RNAi) ซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันการติดไวรัสของราเจ้าบ้าน [46] *T. marneffei* เป็นราฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง พบได้ทั่วไปในธรรมชาติในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย [47] ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *T. marneffei* ที่มี TmPV1 จะทำให้การรักษายากขึ้น

บทสรุป

ราที่ถูกศึกษาและจัดอนุกรมวิธานแล้วประมาณ 120,000 สปีชีส์ [48] แต่ไมคอไวรัสที่ถูกค้นพบมีเพียงประมาณ 300 ชนิด แสดงว่ามีไมคอไวรัสจำนวนมากที่ยังคงรอคอยการค้นพบ การค้นหาไมคอไวรัสชนิดใหม่ค่อนข้างยากเนื่องจากเจ้าบ้านส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการและอัตราการติดเชื้อค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้การวิจัยที่เกี่ยวกับสารพันธุกรรมของไมคอไวรัสที่เป็นอาร์เอ็นเอทำได้ยาก และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการศึกษาสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ วิธีวิจัยและการพัฒนาเครื่องมือในการวิเคราะห์ใหม่ ๆ จะสนับสนุนให้การศึกษาด้านไมคอไวรัสมีความง่ายและรวดเร็วขึ้น ในปัจจุบันรายงานวิจัยเกี่ยวกับไมคอไวรัสส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการรายงานไวรัสชนิดใหม่และการจัดจำแนกตัวอย่างเพื่อสร้างฐานข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการวิจัยในอนาคต การทดลองในเชิงประยุกต์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น การทดลองติดเชื้อไมคอไวรัสที่ลดความรุนแรงในการก่อโรคในราต่างจีนัสที่เป็นศัตรูพืชและการใช้ไมคอไวรัสเพิ่มความสามารถในการทนแล้งให้กับพืชเศรษฐกิจเพิ่มโอกาสการใช้ไมคอไวรัสให้เป็นประโยชน์ในการเกษตรและการใช้ไมคอไวรัสที่ไม่ทำให้เจ้าบ้านผิดปกติมาพัฒนาเป็นเวคเตอร์สำหรับแสดงออกยีน เช่น แคปซิดเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตวัคซีน เป็นต้น อย่างไรก็ตามด้วยลักษณะทางสรีรวิทยาของราไมคอไวรัสส่วนใหญ่ไม่ติดต่อโดยการสัมผัสกับ วิริออน จึงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. Revill PA, Wright PJ. RT-PCR detection of dsRNAs associated with La France disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. J Virol Methods 1997;63(1-2):17-26.
2. Nuss DL. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. Microbiol Rev 1992;56(4):561-76.
3. Ghabrial SA. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. Virus Genes 1998;16(1):119-31.
4. Wickner RB. Killer systems in *Saccharomyces cerevisiae*: three distinct modes of exclusion of M2 double-stranded RNA by three species of double-stranded RNA, M1, L-A-E, and L-A-HN. Mol Cell Biol 1983;3(4):654-61.
5. Yu X, Li B, Fu Y, Jiang D, Ghabrial SA, Li G, et al. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107 (18):8387-92.
6. Cai G, Myers K, Fry WE, Hillman BI. Phytophthora infestans RNA virus 2, a novel RNA virus from *Phytophthora infestans*, does not belong to any known virus group. Arch Virol 2019;164 (2):567-72.
7. McCurrach KJ, Rothnie HM, Hardman N, Glover LA. Identification of a second retrotransposon-related element in the genome of *Physarum polycephalum*. Curr Genet 1990;17(5):403-8.
8. King AMQ, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adams MJ, Dutilh BE, Gorbalenya AE, et al. Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). Arch Virol 2018;163(9):2601-31.
9. Donaire L, Pagan I, Ayllon MA. Characterization of Botrytis cinerea negative-stranded RNA virus 1, a new mycovirus related to plant viruses, and a reconstruction of host pattern evolution in negative-sense ssRNA viruses. Virology 2016;499:212-8.
10. Jom-in S, Akarapisan A. Characterization of double-stranded RNA in *Trichoderma* spp. isolates in Chiang Mai province. J Agr Technol 2009;5(2):261-70.
11. บุณยฤทธิ์ จันทวิมล. อาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ; 2554.
12. Voth PD, Mairura L, Lockhart BE, May G. Phylogeography of *Ustilago maydis virus H1* in the USA and Mexico. J Gen Virol 2006;87(Pt 11):3433-41.
13. van Diepeningen AD, Debets AJ, Hoekstra RF. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. Fungal Genet Biol 2006;43(6):446-52.
14. Hansen LJ, Sandmeyer SB. Characterization of a transpositionally active Ty3 element and identification of the Ty3 integrase protein. J Virol 1990;64(6):2599-607.
15. Morris TJ, Dodds JA. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. Phytopathology 1979;69: 854-8.

16. Alves-Freitas DMT, Pinheiro-Lima B, Faria JC, Lacorte C, Ribeiro SG, Melo FL. Double-stranded RNA high-throughput sequencing reveals a new cytorhabdovirus in a bean golden mosaic virus-resistant common bean transgenic line. Viruses 2019;11(1):pii:E90.
17. Okada R, Kiyota E, Moriyama H, Fukuhara T, Natsuaki T. A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. J Gen Plant Pathol 2015;81(2):103-7.
18. Edy VG, Szekely M, Loviny T, Dreyer C. Action of nucleases on double-stranded RNA. Eur J Biochem 1976;61(2):563-72.
19. Tran TT, Li H, Nguyen DQ, Jones MGK, Wylie SJ. Co-infection with three mycoviruses stimulates growth of a *Monilinia fructicola* isolate on nutrient medium, but does not induce hypervirulence in a natural host. Viruses 2019;11(1):pii:E89.
20. Rodriguez-Cousino N, Maqueda M, Ambrona J, Zamora E, Esteban R, Ramirez M. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. Appl Environ Microbiol 2011;77(5):1822-32.
21. te Velthuis AJ. Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. Cell Mol Life Sci 2014;71(22):4403-20.
22. Luque D, Gomez-Blanco J, Garriga D, Brilot AF, Gonzalez JM, Havens WM, et al. Cryo-EM near-atomic structure of a dsRNA fungal virus shows ancient structural motifs preserved in the dsRNA viral lineage. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111(21):7641-6.
23. Froussard P. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. Nucleic Acids Res 1992;20(11):2900.
24. Coutts RH, Livieratos IC. Nucleotide sequence and genome organization of cucurbit yellow stunting disorder virus RNA1. Arch Virol 2003;148(10):2055-62.
25. Kotta-Loizou I, Coutts RH. Studies on the Virome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveal novel dsRNA elements and mild hypervirulence. PLoS Pathog 2017;13(1):e1006183.
26. Liu S, Xie J, Cheng J, Li B, Chen T, Fu Y, et al. Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector. Proc Natl Acad Sci USA 2016;113(45):12803-8.
27. Suzuki N, Supyani S, Maruyama K, Hillman BI. Complete genome sequence of Mycoreovirus-1/Cp9B21, a member of a novel genus within the family *Reoviridae*, isolated from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. J Gen Virol 2004;85(Pt 11):3437-48.
28. Polashock JJ, Hillman BI. A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(18):8680-4.
29. Nibert ML, Ghabrial SA, Maiss E, Lesker T, Vainio EJ, Jiang D, et al. Taxonomic reorganization of family *Partitiviridae* and other recent progress in partitivirus research. Virus Res 2014;188:128-41.

30. Howitt RL, Beever RE, Pearson MN, Forster RL. Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, Botrytis virus X, reveals high amino acid identity to genes from plant 'potex-like' viruses. Arch Virol 2006;151(3):563-79.
31. Nerva L, Varese GC, Falk BW, Turina M. Mycoviruses of an endophytic fungus can replicate in plant cells: evolutionary implications. Sci Rep 2017;7(1):1908.
32. Andika IB, Wei S, Cao C, Salaipeth L, Kondo H, Sun L. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: a naturally occurring cross-kingdom viral infection. Proc Natl Acad Sci USA 2017;114 (46):12267-72.
33. Stauder CM, Nuss DL, Zhang DX, Double ML, MacDonald WL, Metheny AM, et al. Enhanced hypovirus transmission by engineered super donor strains of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, into a natural population of strains exhibiting diverse vegetative compatibility genotypes. Virology 2019;528:1-6.
34. Yu X, Li B, Fu Y, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, et al. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110(4):1452-7.
35. Marquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. Science 2007;315(5811):513-5.
36. Ahn IP, Lee YH. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola*. Mol Plant Microbe Interact 2001;14(4):496-507.
37. Schmitt MJ, Schernikau G. Construction of a cDNA-based K-1/K-2/K-28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Technol Biotech 1997;35(4):281-5.
38. Rodriguez-Cousino N, Gomez P, Esteban R. Variation and distribution of L-A helper totiviruses in *Saccharomyces sensu* stricto yeasts producing different killer toxins. Toxins 2017;9(10).
39. Radler F, Herzberger S, Schonig I, Schwarz P. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. J Gen Microbiol 1993;139(3):495-500.
40. de Sa PB, Li H, Havens WM, Farman ML, Ghabrial SA. Overexpression of the victoriocin gene in *Helminthosporium* (*Cochliobolus*) *victoriae* enhances the antifungal activity of culture filtrates. Phytopathology 2010;100(9): 890-6.
41. Schmitt MJ, Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. FEMS Microbiol Rev 2002;26(3):257-76.
42. Jiang D, Ghabrial SA. Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum virus*: reconsideration of the taxonomy of the genus *Chrysovirus*. J Gen Virol 2004;85(Pt 7):2111-21.
43. Cafora M, Deflorian G, Forti F, Ferrari L, Binelli G, Briani F, et al. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. Sci Rep 2019;9(1):1527.
44. Krupovic M, Ghabrial SA, Jiang D, Varsani A. *Genomoviridae*: a new family of widespread single-stranded DNA viruses. Arch Virol 2016;161(9):2633-43.

45. Chen WB, Han YF, Jong SC, Chang SC. Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. Appl Environ Microbiol 2000;66(12):5348-52.
46. Lau SKP, Lo GCS, Chow FWN, Fan RYY, Cai JJ, Yuen KY, et al. Novel partitivirus enhances virulence of and causes aberrant gene expression in *Talaromyces marneffei*. MBio 2018;9(3).
47. Vanittanakom N, Cooper CR, Jr., Fisher MC, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. Clin Microbiol Rev 2006;19(1):95-110.
48. Hawksworth DL, Lucking R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiol Spectr 2017;5(4).