

# Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi; applications in virus detection and identification

## Extracción y purificación de dsRNAs largos de plantas infectadas con virus y hongos; aplicación en la detección e identificación de virus

<sup>1</sup>Valverde, R. A.\* and <sup>2</sup>De La Torre-Almaraz, R. <sup>1</sup>Department of Plant Pathology & Crop Physiology, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA 70803, USA. <sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Mexico DF, Mexico. \*Autor para correspondencia: RValverde@agcenter.lsu.edu.

Recibido: 30 de junio 2016.

Aceptado: 09 de agosto 2016.

Valverde RA and De La Torre-Almaraz R. 2017. Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi: Applications in virus detection and identification. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:80-105.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1606-9](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-9)

Primera publicación DOI: 22 de Octubre, 2016.

First DOI publication: October 22, 2016.

**Abstract.** Various methods for the extraction and purification of large dsRNAs are used to conduct detection and identification of viruses in plants and fungi. The most widely used protocol consists in phenol extraction and selective binding of dsRNA to cellulose. Purified viral dsRNAs from plants and fungi have been analyzed by gel electrophoresis and used as a complementary tool for virus identification. Moreover, dsRNAs have been used as reagent for reverse transcription PCR, molecular cloning, preparation of probes, and sequencing of RNA viruses. Many RNA viruses and subviral molecules infecting plants and fungi have been

**Resumen.** Se utilizan varios métodos para realizar la extracción y purificación de ARN de doble cadena (dsRNA) largo de plantas y hongos. Los protocolos más utilizados consisten en la extracción de fenol y la unión selectiva de dsRNA a la celulosa. Los dsRNAs virales purificados de plantas y hongos se han analizado por electroforesis con gel y se han utilizado como herramienta complementaria para identificar virus. Asimismo, los dsRNAs se han utilizado como reactivos en PCR de transcriptasa reversa, clonación molecular, preparación de sondas y secuenciación de virus ARN. Se han descubierto muchos virus ARN y moléculas subvirales que infectan plantas y hongos utilizando protocolos de extracción de dsRNA. Las recientes mejoras a los métodos de extracción de dsRNA han aumentado la eficiencia y la rentabilidad. Se ha comprobado que el dsRNA viral se puede utilizar como reactivo inicial para la secuenciación de próxima generación de genomas virales.

**Palabras clave:** virus ARN, fitovirus, micovirus, detección de virus.

discovered using dsRNA extraction protocols. Recent improvements on dsRNA extraction methods have increased their efficiency, and cost effectiveness. It has been shown that viral dsRNA can be used as an initial reagent for next generation sequencing of viral genomes.

**Key words:** RNA viruses, plant viruses, mycoviruses, virus detection.

## INTRODUCTION

A variety of methods for the detection and identification of plant and fungal viruses are available to researchers and diagnosticians. For many years, serological methods and biological assays were commonly used in combination with viral nucleic acid detection. Today, nucleic acid-base approaches to virus detection such as polymerase chain reaction (PCR), together with sequencing, are widely used because of the high sensitivity and adaptation to the development of high throughput methods (Bonham *et al.*, 2014). Recently, new technologies for virus detection and identification such as next-generation sequencing (NGS) have become available. NGS is a method with great potential for the detection and identification of plant viruses (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Bonham *et al.*, 2014; Ho and Tzanetakis, 2013). For any nucleic acid-based method for RNA virus detection, efficient and practical RNA extraction protocols are needed. Many methods, including those of commercial kits, are currently available to extract single stranded RNA (ssRNA) from a wide range of biological tissues. Nevertheless, in some cases, the instability of ssRNA can be a factor affecting successful virus detection. The extraction, purification, and gel electrophoresis analysis of large (0.5-20.0 kb) viral double-stranded RNAs (dsRNAs) provide a

## INTRODUCCIÓN

Existen varios métodos para la detección e identificación de fitovirus y micovirus que los investigadores y especialistas en diagnóstico pueden utilizar. Durante muchos años, los métodos serológicos y los ensayos biológicos fueron los más utilizados en combinación con la detección de ácido nucleótico viral. Hoy en día, los métodos basados en ácido nucleico para la detección de virus, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), junto con la secuenciación, son los que más se utilizan en el desarrollo de métodos de alto rendimiento, por su alta sensibilidad y adaptación (Bonham *et al.*, 2014). Recientemente han surgido nuevas tecnologías para la detección e identificación de virus, como la secuenciación de próxima generación (NGS). La NGS es un método con gran potencial para la detección e identificación de fitovirus (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Bonham *et al.*, 2014; Ho y Tzanetakis, 2013). En todo método basado en ácido nucleico para la detección de virus ARN se necesitan protocolos de extracción de ARN eficaces y prácticos. Hoy en día existen muchos métodos, incluidos los de kits comerciales, para extraer ARN de una sola cadena de una amplia variedad de tejidos biológicos. No obstante, en algunos casos, la inestabilidad del ARN de una sola cadena puede ser un factor que afecta la detección exitosa de los virus. La extracción, purificación y análisis de ARN de doble cadena largos (dsRNAs) (0.5-20.0 kb) por electroforesis proporciona una herramienta complementaria a los científicos que pretenden detectar e identificar virus en plantas (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Morris y Dodds, 1979; Valverde *et al.*, 1990b), así como una fuente de ARN que se puede utilizar en otros métodos de detección e identificación basados en ácido nucleico de virus ARN.

El dsRNA largo ha sido reconocido como material genético en muchos virus de plantas, animales,

complementary tool for scientists aiming to detect and identify plant viruses (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Morris and Dodds, 1979; Valverde *et al.*, 1990b). Moreover, it also provides a source of RNA that can be used in other nucleic acid-based detection and identification methods for RNA viruses.

Large dsRNA has been recognized as genetic material in many plant, animal, fungal, and bacterial viruses (Libonati *et al.*, 1980). Some biological functions of dsRNA include the capacity to induce interferon and the inhibition of protein synthesis in eukaryotes (Libonati *et al.*, 1980). DsRNA is resistant to RNases under high ionic strength conditions. Under standard assay conditions (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7), dsRNA is resistant to RNase A but not to RNases of the pancreatic type (Libonati and Sorrentino, 1992). Another unique property of dsRNA is that it binds to cellulose in ethanol-containing buffers. Optimally, dsRNA binds to fibrous cellulose at ethanol concentrations of about 16 % (Franklin, 1966; Morris and Dodds, 1979). The relatively high stability of dsRNA and the availability of extraction methods make the use of dsRNA practical for the detection and identification of RNA viruses.

In most plants and fungi infected with RNA viruses, dsRNAs can be found as part of: 1) genomic segments of dsRNA viruses; 2) replicative forms and replicative intermediates of single-stranded RNA viruses (ssRNA) (Buck, 1999; Horiuchi and Fukuhara, 2004; Jackson *et al.*, 1971; Libonati *et al.*, 1980; Nuss and Koltin, 1990; Zelcer *et al.*, 1981); 3) subgenomic viral RNAs (sgRNAs) (Condit and Fraenkel-Conrat, 1979; Osman and Buck 1990); 4) satellite viruses (Klein and Reichman, 1970; Hillman *et al.*, 2000; Valverde and Dodds, 1986); 5) satellite RNAs (Demler and de Zoeten, 1989; Liu *et al.*, 2015); and 6) defective interfering RNAs (Burgyan *et al.*, 1989; Hillman *et al.*, 2000). Serological detection of dsRNAs

hongos y bacteriófagos (Libonati *et al.*, 1980). Algunas funciones biológicas del dsRNA incluyen la capacidad de inducir interferones e inhibir la síntesis proteica en las células eucariotas (Libonati *et al.*, 1980). El DsRNA es resistente a las ribonucleasas (RNases) bajo condiciones de elevada fuerza iónica. En condiciones normales de ensayo (0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sodio, pH 7), el dsRNA es resistente a la RNase A pero no a las RNases de tipo pancreático (Libonati y Sorrentino, 1992). Otra propiedad única del dsRNA es que se une a la fibra de celulosa en buffers que contienen etanol. Lo óptimo es que el dsRNA se una a la fibra de celulosa en concentraciones de etanol de aproximadamente 16 % (Franklin, 1966; Morris y Dodds, 1979). La estabilidad relativamente alta del dsRNA y la disponibilidad de métodos de extracción hacen que el uso del dsRNA resulte práctico en la detección e identificación de virus ARN.

En muchas plantas y hongos infectados con virus ARN se pueden encontrar dsRNAs como parte de: 1) segmentos genómicos virales dsRNA; 2) formas replicativas e intermediarios replicativos de virus ARN de una sola (Buck, 1999; Horiuchi y Fukuhara, 2004; Jackson *et al.*, 1971; Libonati *et al.*, 1980; Nuss y Koltin, 1990; Zelcer *et al.*, 1981); 3) ARNs subgenómicos virales (sgRNAs) (Condit y Fraenkel-Conrat, 1979; Osman y Buck 1990); 4) virus satélite (Klein y Reichman, 1970; Hillman *et al.*, 2000; Valverde y Dodds, 1986); 5) ARNs satélite (Demler y de Zoeten, 1989; Liu *et al.*, 2015); y 6) ARNs de interferencia defectuosa (Burgyan *et al.*, 1989; Hillman *et al.*, 2000). También se ha reportado detección serológica de dsRNAs de plantas y hongos infectados por virus. Como antisuero contra el ácido poliinosínico-policitídilico (polyi:c) se ha utilizado un análogo sintético de ARN de doble cadena de plantas infectadas con el *Virus del mosaico del pepino* (CMV) y el *Virus de la tristeza de los cítricos* (CTV), y *Penicillium chrysogenum*

from virus-infected plants and fungi has also been reported. An antiserum against polyinosinic-polycytidylic acid (polyi:c), a synthetic analog of double-stranded RNA, has been used to detect dsRNA from plants infected with *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Citrus tristeza virus* (CTV) and *Penicillium chrysogenum* infected with *Penicillium chrysogenum virus* using serological techniques (Aramburu *et al.*, 1991). These techniques showed similar sensitivity for the detection of dsRNA as separation by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. DsRNAs from *Cowpea mosaic virus* and *Sugar cane mosaic virus* have been detected in infected tissue extracts using serologically specific electron microscopy (Derrick *et al.*, 1994). Monoclonal antibodies to dsRNA have been developed and used to detect *Ground nut rosette virus* in peanut (Schonborn *et al.*, 1991). However, techniques based on serological methods require the development of the specific antibodies, a procedure that is more costly and lengthy than the direct visualization of dsRNA using electrophoresis or RT-PCR detection.

### RNA viruses of plants and fungi

Viruses with ssRNA genomes make up more than 90 % of all known plant viruses. During replication in host cells, ssRNA viruses generate double-stranded replicative forms (RF) which consist of fully base-paired RNA molecules of the genomic RNA and replicative intermediates (Buck, 1999). They have been shown to occur in *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tobacco ringspot virus* infected plants (Buck 1999; Derrick, 1978; German and de Zoeten, 1975; Jackson *et al.*, 1971; Zelcer *et al.*, 1981) and *Oryza sativa endornavirus* (Horiuchi and Fukuhara, 2004) among others. Many ssRNA viruses generate subgenomic RNAs (sgRNAs) to express internal open reading frames. These

infectada con el *Virus Penicillium chrysogenum*, aplicando técnicas serológicas (Aramburu *et al.*, 1991). Estas técnicas mostraron similar sensibilidad en la detección de dsRNA como separación mediante electroforesis en gel de poliácridamida y tinción argéntica. Se han detectado DsRNAs del *Virus del mosaico del caupí* y el *Virus del mosaico de la caña de azúcar* en extractos de tejido infectado utilizando un microscopio electrónico (Derrick *et al.*, 1994). Se han producido anticuerpos monoclonales para dsRNA y se han utilizado para detectar el *Virus de la roseta del maní* en cacahuete (Schonborn *et al.*, 1991). Sin embargo, las técnicas basadas en métodos serológicos requieren la producción de anticuerpos específicos, un procedimiento más costoso y prolongado que la visualización directa del dsRNA por electroforesis o detección por RT-PCR.

### Virus ARN de plantas y hongos

Los virus que contienen genomas de ssRNA constituyen más del 90 % de todos los fitovirus conocidos. Durante su replicación en células huésped, los virus ssRNA producen formas replicativas de doble cadena (RF), que consisten en moléculas de ARN de bases completamente apareadas de ARN genómico e intermediarios replicativos (Buck, 1999). Se ha observado que esto ocurre en plantas infectadas con el *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), el *Virus de la mancha anular del tabaco* (Buck 1999; Derrick, 1978; German y de Zoeten, 1975; Jackson *et al.*, 1971; Zelcer *et al.*, 1981) y el *endornavirus* de *Oryza sativa* (Horiuchi y Fukuhara, 2004), entre otros. Muchos de los virus ARN generan ARNs subgenómicos (sgRNAs) que expresan marcos internos abiertos de lectura. Estos sgRNAs son sintetizados, ya sea a partir de cadenas negativas prematuramente terminadas o, más comúnmente, por un proceso interno en los moldes de la cadena negativa en secuencias específicas del

sgRNAs are synthesized either from prematurely terminated negative strands or, more commonly, by internal initiation on the negative-strand templates at specific promoter sequences (Miller and Koev, 2000). Subgenomic dsRNAs have been detected in plants infected with most RNA viruses and fungi infected with RNA mycoviruses (Condit and Fraenkel-Conrat, 1979; Kwon *et al.*, 2007; Osman and Buck, 1990). Plant viruses with dsRNA genomes include members of the families *Reoviridae*, *Partitiviridae*, *Amalgaviridae*, *Totiviridae*, and *Chrysoviridae*, and their genomic dsRNA are readily detected from plant tissues (Antoniw *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2016; Karan *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2013; Quito *et al.*, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2009; 2011; Wei *et al.*, 2003). With the exception of the *Reoviridae*, the other four families contain plant viruses that do not cause visible symptoms and have been named persistent viruses. In contrast, acute viruses cause symptoms and economically important plant diseases (Roossinck, 2010).

All major taxa of fungi have been shown to contain viruses. Although most fungal viruses described to date have dsRNA genomes, there are some with ssRNA genomes and one report of a ssDNA genome (Ghabrial *et al.*, 2015). There are many citations in the literature of the presence of viral dsRNAs in fungi (Azzam and Gonsalves, 1999; Castillo *et al.*, 2011; Day *et al.*, 1977; Delye and Corio-Costet, 1998; Dickinson and Pryor, 1989; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa and Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Shamoun *et al.*, 2008); however, in most cases these viruses do not appear to affect the host's phenotype (Enebak *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2003). Only in some cases they have been associated with phenotypic and genotypic variations (Castanho *et al.*, 1978; Ghabrial *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2003). The ability of some mycoviruses to induce hypovirulence has been used for biological control

promotor (Miller and Koev, 2000). Se han detectado dsRNAs subgenómicos en plantas infectadas con numerosos virus ARN, y en hongos infectados con micovirus ARN (Condit y Fraenkel-Conrat, 1979; Kwon *et al.*, 2007; Osman y Buck, 1990). Los fitovirus con genomas de dsRNA incluyen miembros de las familias *Reoviridae*, *Partitiviridae*, *Amalgaviridae*, *Totiviridae* y *Chrysoviridae*, y sus dsRNA genómicos son fácilmente detectables en tejidos vegetales (Antoniw *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2016; Karan *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2013; Quito *et al.*, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2009; 2011; Wei *et al.*, 2003). Con excepción de *Reoviridae*, las otras cuatro familias contienen fitovirus que no producen síntomas visibles y a éstos se les denomina virus persistentes. En cambio, los virus agudos producen síntomas y causan enfermedades de importancia económica en las plantas (Roossinck, 2010).

Se ha descubierto que todos los principales taxones de hongos contienen virus. Aunque casi la mayoría de los micovirus que se han descrito a la fecha tienen genomas de dsRNA, existen algunos con genomas de ssRNA, y se ha reportado uno con genoma de ssDNA (Ghabrial *et al.*, 2015). En la literatura existen muchas referencias sobre la presencia de dsRNAs virales en hongos (Azzam y Gonsalves, 1999; Castillo *et al.*, 2011; Day *et al.*, 1977; Delye y Corio-Costet, 1998; Dickinson y Pryor, 1989; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa y Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Shamoun *et al.*, 2008); sin embargo, parece que en la mayoría de los casos estos virus no afectan el fenotipo del huésped (Enebak *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2003). Solo en algunos casos se les ha asociado con variaciones fenotípicas y genotípicas (Castanho *et al.*, 1978; Ghabrial *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2003). La capacidad de algunos virus de inducir hipovirulencia se ha utilizado en el control biológico de sus huéspedes fúngicos, que son patógenos para las plantas (Nuss y Koltin, 1990). Los



of their fungal hosts that are pathogenic to plants (Nuss and Koltin, 1990). The best known examples of mycovirus-induced hypovirulence are virus strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* (Choi and Nuss, 1992; Day *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 2006). Methods for the extraction and purification of dsRNA have been essential for the discovery, detection, and characterization of mycoviruses (Nuss and Koltin, 1990).

### Satellite viruses, satellite RNAs, defective interfering RNAs, and viroids

Satellites are subviral agents that depend on a helper virus for their replication. Satellite viruses code for their own coat protein and their RNA is encapsidated. Satellite RNAs do not encode capsid proteins, but are packaged in a protein encoded by the helper virus. The size of most satellites associated with plant and fungal viruses range from 2.0-0.4 kb (Hillman *et al.*, 2000; Kaper and Diaz-Ruiz, 1977; Demler and de Zoeten, 1989; Valverde and Dodds, 1987). Defective interfering RNAs (DIs) are RNAs that result from errors in virus replication (Pathak and Nagy, 2009). Satellite RNA viruses, satellite RNAs, and DI RNAs can attenuate or enhance the symptoms caused by their parent virus (Pathak and Nagy, 2009; Habili and Kaper, 1981). Some satellite viruses and RNAs associated with plant viruses accumulate relatively large quantities of dsRNA (Diaz-Ruiz and Kaper, 1977; Dodds *et al.*, 1984; Habili and Kaper, 1981; Valverde and Dodds, 1986; 1987). In fungi, dsRNA satellites have been associated with several dsRNA viruses (Liu *et al.*, 2015; Romanos *et al.*, 1981), and satellite dsRNAs have been reported in *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2015). A satellite RNA of *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a in hypovirulent Isolates of *Sclerotinia homoeocarpa* (Deng and Boland, 2004), and a satellite and DI

ejemplos más conocidos de hipovirulencia inducida por micovirus son las cepas del virus del cancro del castaño *Cryphonectria parasitica* (Choi y Nuss, 1992; Day *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 2006). Los métodos de extracción y purificación de dsRNA han sido fundamentales para el descubrimiento, la detección y la caracterización de micovirus (Nuss y Koltin, 1990).

### Virus satélite, ARNs satélite, ARN de interferencia defectuosa y viroides

Agentes satélite y subvirales dependen de un virus auxiliar para replicarse. Los virus satélite codifican su propia proteína de la cápside, dentro de la cual empaqueta su ARN. Los ARN satélite no codifican proteínas de la cápside, sino que están empaquetados en una proteína codificada por el virus auxiliar. El tamaño de la mayoría de los satélites asociados con los fitovirus y los micovirus varía de 2.0 a 0.4 kb (Hillman *et al.*, 2000; Kaper y Diaz-Ruiz, 1977; Demler y de Zoeten, 1989; Valverde y Dodds, 1987). Los ARN de interferencia defectuosa (DIs) son ARN que resultan a causa de errores en la replicación del virus (Pathak y Nagy, 2009). Los virus ARN satélite, los ARN satélite y los ARN DIs pueden atenuar o aumentar los síntomas causados por su virus progenitor (Pathak y Nagy, 2009; Habili y Kaper, 1981). Algunos virus satélite y ARN asociados con fitovirus acumulan cantidades relativamente grandes de dsRNA (Diaz-Ruiz y Kaper, 1977; Dodds *et al.*, 1984; Habili y Kaper, 1981; Valverde y Dodds, 1986; 1987). En los hongos, los satélites dsRNA se han asociado con diversos virus dsRNA (Liu *et al.*, 2015; Romanos *et al.*, 1981), y se han reportado dsRNAs satélite en *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2015). También se identificaron un ARN satélite de *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a en aislamientos hipovirulentos de *Sclerotinia homoeocarpa* (Deng y Boland, 2004), y

RNAs of *Cryphonectria hypovirus 3-Grand Haven 2* (Hillman *et al.*, 2000) have also been identified.

Viroids are some of the smallest known infectious agents. They consist of non-coding circular ssRNA molecules forming highly base-paired rod-like structures and are capable of causing economically important diseases in many crops worldwide (Kovalskaya and Hammond, 2014). Viroid derived dsRNAs have been described (Carbonell, *et al.*, 2008).

### DsRNA extraction and purification

Over the past 50 years, several methods for large dsRNA extraction from virus-infected plant, animal and fungal tissues, as well as bacteria have been reported in the literature (Akin *et al.*, 1998; Balijja *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; Delye and Corio-Costet, 1998; DePaulo and Powell, 1995; Diaz-Ruiz and Kaper, 1978; Franklin, 1966; Morris and Dodds, 1979, Morris *et al.*, 1983; Okada *et al.*, 2015; Tzanetakis and Martin, 2008; Valverde *et al.*, 1990) (Table 1). Most of these methods are based on cellulose chromatography, some on enzymatic

un satélite y ARN DIs de *Cryphonectria hypovirus 3-Grand Haven 2* (Hillman *et al.*, 2000).

Los viroides son algunos de los agentes infecciosos más pequeños que se conocen. Están formados por moléculas de ARN circulares no codificadas que forman estructuras altamente apareadas en forma de varilla y llegan a causar enfermedades económicamente importantes en muchos cultivos a nivel mundial (Kovalskaya y Hammond, 2014). Se ha descrito un viroide derivado de dsRNAs (Carbonell, *et al.*, 2008).

### Extracción y purificación de DsRNA

En los últimos 50 años, en la literatura se han reportado varios métodos para la extracción de dsRNA largos de plantas, animales y tejidos fúngicos infectados por virus (Akin *et al.*, 1998; Balijja *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; Delye y Corio-Costet, 1998; DePaulo y Powell, 1995; Diaz-Ruiz y Kaper, 1978; Franklin, 1966; Morris y Dodds, 1979, Morris *et al.*, 1983; Okada *et al.*, 2015; Tzanetakis y Martin, 2008; Valverde *et al.*, 1990) (Cuadro 1). La mayoría de estos métodos se basan en

**Table 1. Principal Components of Some dsRNA Extraction Protocols.**  
**Cuadro 1. Componentes principales de algunos protocolos de extracción de dsRNA.**

Principle	Reference
Lithium chloride	Akin <i>et al.</i> , 1998
Recombinant dsRNA-binding protein	Atsumi <i>et al.</i> , 2015
CF-11 cellulose (Whatman)	Balijja <i>et al.</i> , 2008
CF-11 cellulose (Whatman)	Castillo <i>et al.</i> , 2011
Guanidium thiocyanate	Delye and Corio-Costet, 1998
sodium dodecyl sulfate (SDS)/Potassium acetate (KOAc)	DePaulo and Powell, 1995
Lithium chloride	Diaz-Ruiz and Kaper, 1978
CF-11 cellulose (Whatman)	Franklin, 1966
Fibrous cellulose (Sigma)	Khankhum <i>et al.</i> , 2015
CF-11 cellulose (Whatman)	Morris and Dodds, 1979
CF-11 cellulose (Whatman)	Morris <i>et al.</i> , 1983
Cellulose A and D	Okada <i>et al.</i> , 2015
CF-11 cellulose (Whatman)	Tzanetakis and Martin, 2008
CF-11 cellulose (Whatman) or Cellex N-1 (BioRad)	Valverde <i>et al.</i> , 1990

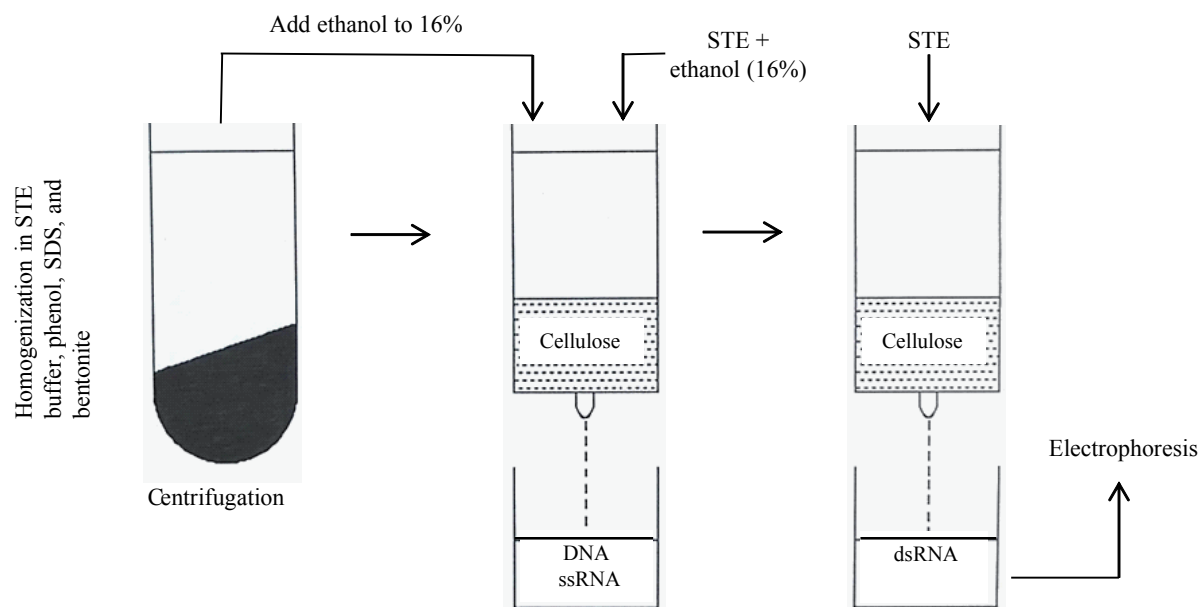
degradation or lithium chloride precipitation. Recently, Atsumi *et al.*, (2015) developed a novel dsRNA isolation method using a recombinant dsRNA-binding protein.

In 1979, Morris and Dodds developed a procedure for the isolation and analysis of dsRNA which has been widely used for the detection, identification, and characterization of plant viruses. It consists on the selective adsorption of dsRNA to fibrous cellulose at low ethanol concentrations and elution with ethanol-free buffer. A schematic diagram summarizing the steps involved in the method is shown in Figure 1. Although developed over 40 years ago, it is still in use today although it has been modified and improved (Khankhum *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 1990).

Homogenizing by grinding fresh, infected tissue, often with mortar and pestle using liquid

cromatografía de celulosa, algunos en degradación enzimática o precipitación con cloruro de litio. Recientemente, Atsumi *et al.*, (2015) desarrollaron un novedoso método para aislar dsRNA utilizando una proteína recombinante de unión al dsRNA.

En 1979, Morris y Dodds desarrollaron un procedimiento para el aislamiento y análisis de dsRNA que ha sido muy utilizado en la detección, identificación y caracterización de fitovirus. El procedimiento consiste en la absorción selectiva de dsRNA en celulosa de fibra en bajas concentraciones de etanol y elución con un búfer libre de etanol. En la Figura 1 se muestra un diagrama esquemático con un resumen de los pasos que se siguen en este método. Aunque el método se desarrolló hace más de 40 años, sigue utilizándose hoy en día, con algunas modificaciones y mejoras (Khankhum *et al.*, 2016; Valverde *et al.*, 1990).



**Figure 1.** Schematic diagram of the steps involved in dsRNA extraction and purification. (Modified from Valverde *et al.*, 1990). STE: Sodium, Tris and EDTA buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0 and 1 mM EDTA); SDS: sodium dodecyl sulfate.

**Figura 1.** Diagrama esquemático de los pasos para la extracción y purificación de dsRNA. (Modificado de Valverde *et al.*, 1990). STE: Sodio, Tris y búfer EDTA (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0 y 1 mM EDTA); SDS: Dodecilsulfato sódico.



nitrogen, is the first step in the extraction of dsRNA. However, buffered sap extracts, fresh or lyophilized fungal mycelium, dried spores, and desiccated plant tissue (including those infected with biotrophic fungi) have also been used with successful results (Morris *et al.*, 1983; Khankhum *et al.*, 2015; Kousik *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990). Other practical and efficient approaches for disrupting the tissue include bead beaters, tissue homogenizers, etc. Desiccated tissue has broad use because this method is conventionally used for the long-term storage of virus-infected tissue. It is also the way samples are exchanged between laboratories. Furthermore, biotrophic fungi infecting plant tissues are often stored in fungaria as pressed and dried specimens from which samples can be used to test for the presence of fungal viruses (Khankhum *et al.*, 2015). In the case of plants, most extractions are done from foliar tissue. However, bark, stem, or vein tissue are recommended for phloem-limited viruses. For fungi, mycelium or spores can be used. Negative controls are highly recommended in any dsRNA extraction. The second step involves total nucleic acid extraction using buffer-saturated phenol. With some plant tissues and particular viruses buffer may be used instead of phenol. Nevertheless, phenol extracts usually yield cleaner samples. The third step involves binding of the dsRNA to fibrous cellulose. The cellulose used by Morris and Dodds (1979) and Franklin (1966) in their original papers was Whatman CF-11 (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA). Because this cellulose is no longer commercially available, other cellulose types such as Cellex-N1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) have been used in dsRNA purifications with some success (Okada *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 1990). Khankhum *et al.*, (2015) used fibrous cellulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to extract dsRNAs from virus-infected plants and

El primer paso en la extracción de dsRNA consiste en homogeneizar por molienda tejido infectado fresco utilizando nitrógeno líquido; la molienda suele hacerse con mortero y mano. Sin embargo, también se han utilizado con buenos resultados extractos de savia, micelios fúngicos frescos o liofilizados, esporas secas y tejido deshidratado de plantas con un buffer (incluyendo tejidos infectados con hongos biotrofos) (Morris *et al.*, 1983; Khankhum *et al.*, 2015; Kousik *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990). Otros métodos prácticos y eficientes para el macerado del tejido incluyen batiadoras de laboratorio, homogeneizadores de tejido, etcétera. El tejido deshidratado infectado con virus puede almacenarse por largos periodos de tiempo, en espacios pequeños y utilizarse como fuente de inóculo para ensayos posteriores, y porque permite también el intercambio de muestras entre laboratorios. Además, los hongos biotrofos que infectan tejidos vegetales suelen almacenarse en depósitos como especímenes prensados y desecados, de los cuales se pueden obtener muestras para comprobar la presencia de micovirus (Khankhum *et al.*, 2015). En el caso de plantas, se utiliza tejido foliar en la mayoría de las extracciones. Sin embargo, se recomienda el uso de tejidos de corteza, tallo o vaina para algunos virus del floema. Para los hongos se pueden utilizar micelios o esporas. En toda extracción de dsRNA se recomiendan controles negativos. El segundo paso incluye la extracción total del ácido nucleico utilizando fenol saturado con un buffer. Con algunos tejidos vegetales y virus en particular es posible utilizar un buffer en lugar de fenol. No obstante, con los extractos fenólicos normalmente se obtienen muestras más limpias. El tercer paso incluye la unión del dsRNA a la celulosa de fibra. La celulosa que utilizaron Morris y Dodds (1979) y Franklin (1966) en sus primeros estudios fue Whatman CF-11 (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA). Dado que esta celulosa desapareció

fungi. This cellulose is readily available worldwide and a good alternative to CF-11. After ethanol precipitation, dsRNA samples must be treated with DNase to eliminate potential host DNA contamination. Host ribosomal RNA may interfere with the electrophoretic detection of dsRNAs ranging from 1.0-0.5 kb. Therefore, when the target dsRNAs are within this range, digestion with S1 nuclease is recommended. After that, analysis of dsRNAs can be conducted in 6 % polyacrylamide gels, which provide high resolving power for subgenomic dsRNAs or, more simply, using 1.2-1.5 % agarose gels. Traditionally, ethidium bromide has been the preferred stain, although silver nitrate staining has been used as well. More recently, staining with Gel Red™ (Huang *et al.*, 2010) has become more common. GelRed does not have the health hazards associated with ethidium bromide and has higher sensitivity. Detailed information of the methodology developed by Morris and Dodds (1979) and data showing some of its applications has been published elsewhere (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Valverde *et al.*, 1986; 1990b).

Initially, the focus of the dsRNA extraction protocols was on the electrophoretic analysis and evaluation of banding patterns for virus detection and, in some cases, identification. Although analysis of viral dsRNAs by gel electrophoresis is still widely used, currently most applications are in RT-PCR, molecular cloning, sequencing, genome assembly, and virus identification.

### **Virus detection and identification**

In many cases, particularly with ssRNA viruses infecting plants that contain high amounts of phenolic compounds and carbohydrates, diagnosticians and researchers find it difficult to obtain pure preparations of ssRNA or virus to use in identification and characterization. An

del mercado, para la purificación de dsRNA se han utilizado otros tipos de celulosa, como Cellex-N1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que han dado algunos buenos resultados (Okada *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 1990). Khankum *et al.*, (2015) utilizaron celulosa de fibra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para extraer dsRNAs de plantas y hongos infectados con virus. Esta celulosa se puede conseguir fácilmente en cualquier parte del mundo y es una buena opción para sustituir a la celulosa CF-11. Después de ser sometidas a precipitación en etanol, las muestras tienen que ser tratadas con DNase para eliminar la posibilidad de que el DNA huésped se contamine. El ARN ribosómico huésped podría interferir en la detección electroforética de los dsRNAs de 1.0 a 0.5 kb. Por lo tanto, cuando los dsRNAs objetivo están dentro de este rango, se recomienda la digestión con nucleasa S1. Después de esto, se puede realizar el análisis de los dsRNAs en geles de poliacrilamida al 6 %, lo cual proporciona un alto poder de resolución en los dsRNAs subgenómicos, o, de manera más simple, se pueden utilizar geles de agarosa al 1.2-1.5 %. Tradicionalmente, el bromuro de etidio ha sido la tinción preferida, aunque también se ha utilizado la tinción de nitrato de plata. Más recientemente, se ha vuelto más común la tinción con Gel Red™ (Huang *et al.*, 2010). GelRed no implica riesgos para la salud como los riesgos asociados con el bromuro de etidio y tiene mayor sensibilidad. En otras fuentes se ha publicado información detallada y datos que muestran algunas de las aplicaciones de la metodología que desarrollaron Morris y Dodds (1979) (Dodds *et al.*, 1984; 1988; Valverde *et al.*, 1986; 1990b).

Inicialmente, los protocolos de extracción de dsRNA se enfocaban en el análisis electroforético y la evaluación de los patrones de bandas para detectar los virus y, en algunos casos, identificarlos. Aunque todavía sigue utilizándose el análisis de dsRNAs virales mediante electroforesis con gel, hoy

alternative is to purify dsRNAs that can be used for probe preparation, RT-PCR, molecular cloning, and sequencing.

In general, different families of RNA viruses infecting plants or fungi yield characteristic electrophoretic dsRNA banding patterns that differentiate them (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1986). DsRNA electrophoretic profiles have been reported for members of the families *Closteroviridae* (Dodds and Bar-Joseph, 1983), *Potyviridae* (Valverde *et al.*, 1986), *Bromoviridae* (Valverde and Glascock, 1991), *Endornaviridae* (Fukuhara *et al.*, 2006) and the genera *Comovirus* (Valverde *et al.*, 1995), *Tobamovirus*, *Potexvirus*, and *Carlavirus* (Valverde *et al.*, 1986). As mentioned earlier, dsRNA profiles generally consist of one (in the case of monopartite viruses), two (bipartite) or more (multipartite) full-length genomic bands (or RFs) and several other bands corresponding to subgenomic replicative forms of RNA viruses (Condit and Fraenkel-Conrat, 1979; Osman and Buck, 1990). Figures 2 and 3 show dsRNA profiles of different plant viruses resolved in polyacrylamide and agarose gels. In the case of fungal viruses, dsRNA electrophoretic profiles have not been evaluated as extensively as a tool to differentiate between families or genera. Nevertheless, as in the case of plant RNA viruses, electrophoretic profiles vary depending upon the virus species and mixed infections are common (Figure 4).

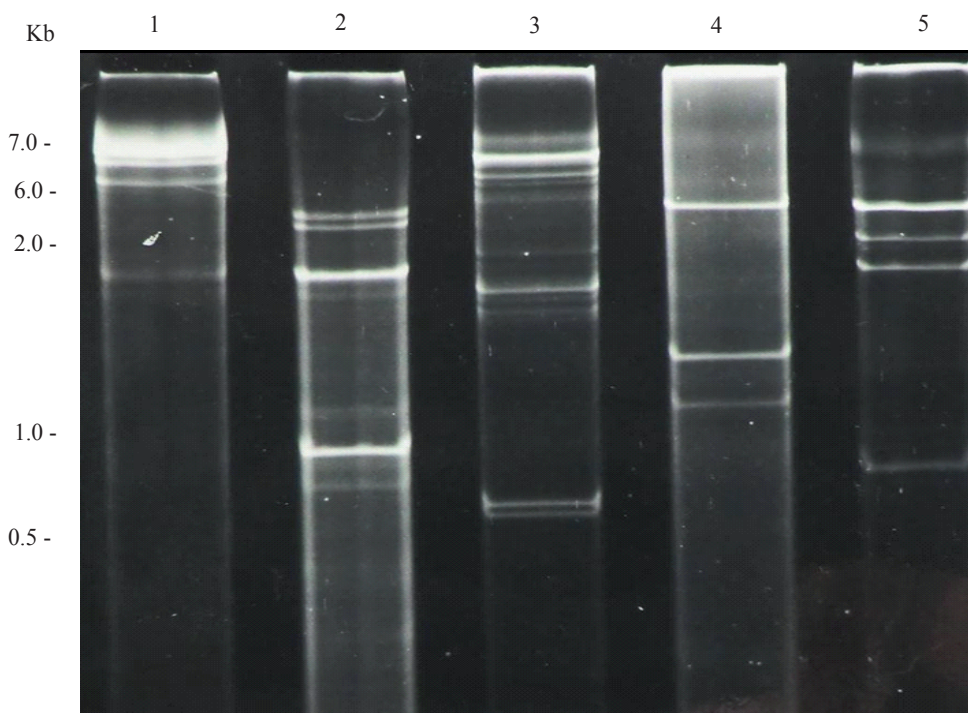
Extraction and electrophoretic analyses of dsRNA has been used widely to study important viruses such as *Citrus tristeza virus* (CTV) (Dodds and Bar-Joseph, 1983; Dodds *et al.*, 1993) and viruses of *C. parasitica*, the causal agent of chestnut blight (Casthano *et al.*, 1978; Day *et al.*, 1977; Hansen *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 2006). In the literature, there are numerous examples of the use of viral dsRNA to detect, identify, and

en día la mayoría de las aplicaciones se hacen en RT-PCR, clonación molecular, secuenciación, ensamblado genómico e identificación de virus.

### Detección e identificación de virus

En muchos casos, particularmente con los virus ARN que infectan plantas que contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos y carbohidratos, es difícil para los expertos en diagnóstico y los investigadores obtener preparaciones puras de ARN o de virus que puedan ser utilizadas en la identificación o caracterización. Una opción es purificar dsRNAs que puedan ser utilizados en la preparación de sondas, RT-PCR, clonación molecular y secuenciación.

En general, las diferentes familias de virus RNA que infectan plantas u hongos producen patrones característicos de bandas electroforéticas de dsRNA que los diferencian (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1986). Se han reportado perfiles electroforéticos de dsRNA en miembros de las familias *Closteroviridae* (Dodds y Bar-Joseph, 1983), *Potyviridae* (Valverde *et al.*, 1986), *Bromoviridae* (Valverde y Glascock, 1991), *Endornaviridae* (Fukuhara *et al.*, 2006) y de los géneros *Comovirus* (Valverde *et al.*, 1995), *Tobamovirus*, *Potexvirus*, y *Carlavirus* (Valverde *et al.*, 1986). Como se mencionó anteriormente, los perfiles de dsRNA generalmente constan de una (en el caso de los virus monopartitas), dos (bipartita) o más (multipartita) bandas genómicas de longitud completa (o RF) y varias otras bandas que corresponden a las formas subgenómicas replicativas de los virus RNA (Condit y Fraenkel-Conrat, 1979; Osman y Buck, 1990). En las Figuras 2 y 3 se muestran perfiles de dsRNA de diferentes fitovirus resueltos en geles de poliacrilamida y agarosa. En el caso de los micovirus, los perfiles electroforéticos de dsRNA no se han evaluado extensamente como una herramienta para



**Figure 2.** Polyacrylamide (6 %) gel electrophoresis of dsRNA extracted from plants infected with different viruses. Lane 1, *Potato virus X*; lane 2, *Cucumber mosaic virus*; lane 3, *Tobacco mild green mosaic virus*; lane 4, *Tobacco necrosis virus*; and lane 5, *Alfalfa mosaic virus*.

**Figura 2.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (6%) de dsRNA extraído de plantas infectadas con diferentes virus. Carril 1, *Virus de la papa X*; carril 2, *Virus del mosaico del pepino*; carril 3, *Virus del mosaico verde suave del tabaco*; carril 4, *Virus de la necrosis del tabaco*; carril 5, *Virus del mosaico de la alfalfa*.

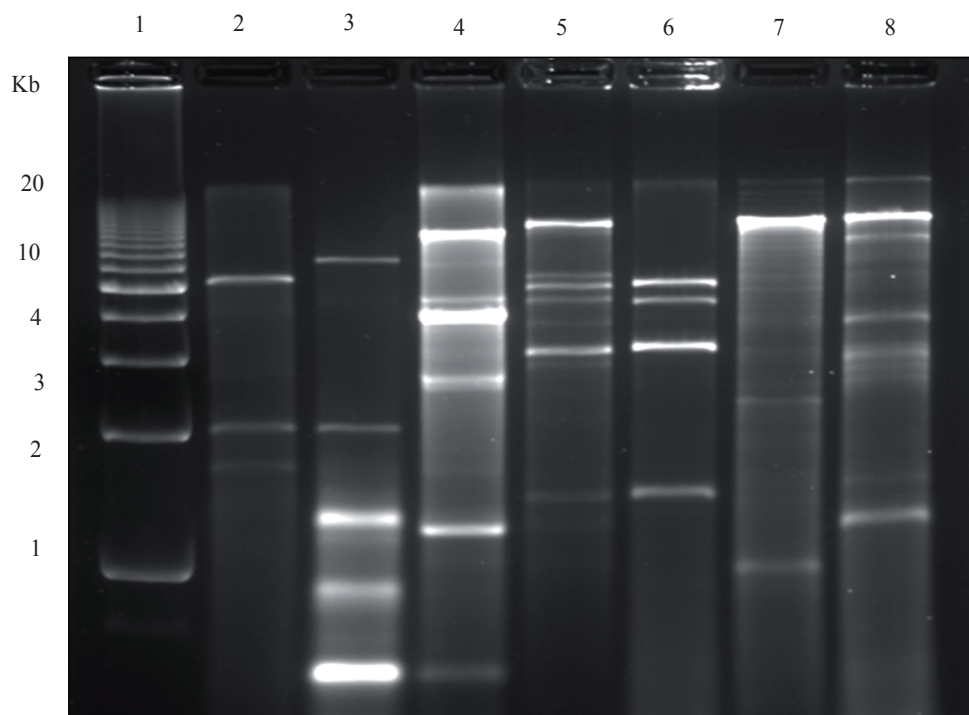
study viruses, satellites, and DIs infecting plants (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; De la Torre, *et al.*, 2014; 2016; Demler and Zoeten, 1989; Dodds, 1982; Falk *et al.*, 1979; Okada *et al.*, 2011; Valverde and Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2009) and fungi (Azzam and Gonsalves, 1999; Deng and Boland, 2004; Kousik *et al.*, 1994; Feldman *et al.* 2012; Pecina *et al.*, 2000; Shamoun *et al.*, 2008).

In plants, mixed viral infections often go undetected and can result in inadequate disease diagnoses. An advantage of dsRNAs analysis is that, unlike other virus diagnostic techniques, is nonspecific and therefore it is possible to visualize mixed viral infections (Figure 5). In fungi, mixed infections of mycoviruses are commonly detected

diferenciarlos entre familias y géneros. No obstante, igual que en el caso de los micovirus RNA, los perfiles electroforéticos varían dependiendo de la especie del virus, y son comunes las infecciones mixtas (Figura 4).

La extracción y los análisis electroforéticos de dsRNA se han utilizado extensamente para estudiar importantes virus como el *Virus citrus tristeza* (CTV) (Dodds y Bar-Joseph, 1983; Dodds *et al.*, 1993) y el virus de *C. parasitica*, agente causante del cancro del castaño (Casthano *et al.*, 1978; Day *et al.*, 1977; Hansen *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 2006). En la literatura existen numerosos ejemplos del uso de dsRNA viral para detectar, identificar y estudiar los virus, los satélites y los DIs que infectan plantas (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; De la





**Figure 3.** Agarose (1.2 %) gel electrophoresis of dsRNAs extracted from plants infected with different viruses. Lane 1, Molecular weight DNA ladder; lane 2, *Tobacco necrosis virus*; lane 3, *Panicum mosaic virus* and satellite virus; lane 4, *Japanese holly fern mottle virus*; lane 5, *Tobacco mosaic virus*, *Alfalfa mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* mixed infection; lane 6, *Cucumber mosaic virus*; lane 7, TMV; lane 8, *Tomato mild green mosaic virus*.

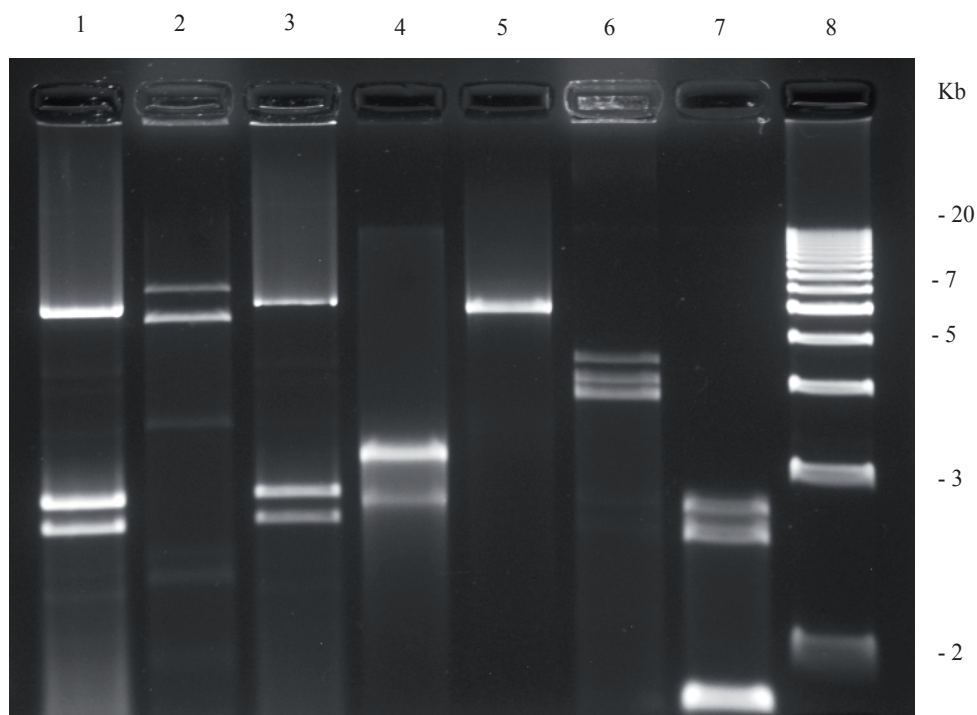
**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) de dsRNAs extraídos de plantas infectadas con diferentes virus. Carril 1, Peso molecular de la escalera de ADN; carril 2, *Virus de la necrosis del tabaco*; carril 3, *Virus del mosaico del pasto y virus satélite*; carril 4, *Virus del moteado del helecho japonés*; carril 5, infección mixta *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), *Virus del mosaico de la alfalfa* y *Virus del mosaico del pepino*; carril 6, *Virus del mosaico del pepino* (CMV); carril 7, TMV; carril 8, *Virus del mosaico verde suave del tomate*.

by electrophoretic analysis of their dsRNAs (Chu *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2012; Kousik *et al.*, 1994). Another advantage of this technique is that in some cases, strains of the same virus can be differentiated by the mobility or the number of dsRNA fragments after gel electrophoresis. This has been shown with various strains of Tobacco mosaic virus satellite (Valverde and Dodds, 1987). Moreover, gel electrophoretic profiles of viral dsRNA have been used to differentiate strains of *Tomato mosaic virus* (Valverde *et al.*, 1986), CMV (Valverde *et al.*, 1990a), and CTV (Dodds *et al.*, 1987). Nevertheless, in plants, members of the viral

Torre, *et al.*, 2014; 2016; Demler y Zoeten, 1989; Dodds, 1982; Falk *et al.*, 1979; Okada *et al.*, 2011; Valverde y Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2009) y hongos (Azzam y Gonsalves, 1999; Deng y Boland, 2004; Kousik *et al.*, 1994; Feldman *et al.* 2012; Pecina *et al.*, 2000; Shamoun *et al.*, 2008).

En las plantas, las infecciones mixtas virales no son fácilmente detectables y, en consecuencia, se hacen diagnósticos inadecuados. Una ventaja del análisis de dsRNAs es que, a diferencia de otras técnicas de diagnóstico de virus, no es específica y, por tanto, se pueden visualizar las infecciones virales





**Figure 4.** Agarose (1.2 %) gel electrophoresis of dsRNAs extracted from fungi. Lane 1, *Penicillium digitatum* (orange); lane 2, Corn smut; lane 3, *Penicillium digitatum* (mandarin); lane 4, *Diaporthe phaseolorum* isolate B; lane 5, an unidentified totivirus from *D. phaseolorum* isolate C; lane 6, *Penicillium chrysogenum* virus; lane 7, an unidentified virus from *Penicillium stoloniferum*; and lane 8, 1 kb molecular weight DNA ladder.

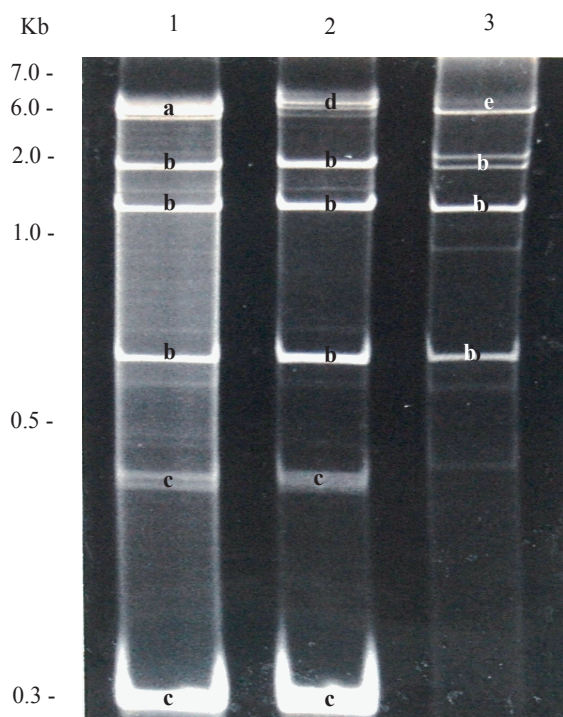
**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) de dsRNAs extraídos de hongos. Carril 1, *Penicillium digitatum* (naranja); carril 2, tizón del maíz; carril 3, *Penicillium digitatum* (mandarina); carril 4, virus aislado de *Diaporthe phaseolorum* B; carril 5, totivirus no identificado de un aislado de *Diaporthe phaseolorum* C; carril 6, Virus *Penicillium chrysogenum*; carril 7, virus no identificado de *Penicillium stoloniferum*; y carril 8, peso molecular 1 kb de una escalera de ADN.

families *Potyviridae* and *Luteoviridae* generate low amounts of RF and subgenomic dsRNAs (Creamer and Falk, 1989; Dale *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1986) making their detection by electrophoretic analysis impractical.

### Molecular probes

Radioactive and non-radioactive probes have been produced by using dsRNA to generate and label ssRNA or cDNAs (Enebak *et al.*, 1994; Jelkmann *et al.*, 1989; Jordan and Dodds, 1983; Rosner *et al.*, 1983; Valverde and Dodds, 1986;

mixtas (Figura 5). En los hongos, las infecciones mixtas de micovirus comúnmente se detectan mediante el análisis electroforético de sus dsRNAs (Chu *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2012; Kousik *et al.*, 1994). Otra ventaja de esta técnica es que en algunos casos se pueden diferenciar las cepas del mismo virus por la movilidad o el número de fragmentos de dsRNA después de la electroforesis en gel. Esto se ha observado con varias cepas del satélite del *Virus del mosaico del tabaco* (Valverde and Dodds, 1987). Además, los perfiles electroforéticos en gel de dsRNA viral se han utilizado para diferenciar cepas del *Virus del mosaico del tomate* (Valverde



**Figure 5.** Polyacrylamide (6 %) gel electrophoresis showing dsRNAs extracted from plants with mixed viral infections. Lane 1, *Potato virus X* (PVX), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and satellite RNA of CMV; lane 2, *Dandelion latent virus* (DLV), CMV and satellite RNA of CMV; and lane 3, *Tobacco mosaic virus* (TMV) and CMV. Bands are labelled with letters according to the virus they belong; a, PVX; b, CMV, c, Satellite RNA of CMV; d, DLV, and e, TMV.

**Figura 5.** Electroforesis en gel de poliacrilamida (6 %) que muestra dsRNAs extraídos de plantas con infecciones virales mixtas. Carril 1, *Virus X* de la papa (PVX), *Virus del mosaico del pepino* (CMV) y RNA satélite; carril 2, *Virus latente del diente de león* (DLV), CMV y RNA satélite; y carril 3, *Virus del mosaico del tabaco* (TMV) y CMV. Las bandas de DsRNA están marcadas con letras de acuerdo con el virus al que pertenecen; a, PVX; b, CMV, c, RNA satélite; d, DLV, y e, TMV.

Valverde *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990b). Jordan and Dodds used TMV dsRNA to develop P32 end-labelled ssRNA probes and used them successfully in molecular hybridization experiments. Non-radioactive probes have also been prepared by direct labelling ssRNA using dsRNA as the

*et al.*, 1986), CMV (Valverde *et al.*, 1990a), y CTV (Dodds *et al.*, 1987). No obstante, en las plantas, los miembros de las familias virales *Potyviridae* y *Luteoviridae* generan bajas cantidades de RF y dsRNAs subgenómicos (Creamer and Falk, 1989; Dale *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1986), lo cual hace que su detección mediante análisis electrofóricos resulte impráctica.

### Sondas moleculares

Se han producido sondas radioactivas y no radioactivas utilizando dsRNA para generar y etiquetar ARN y cDNAs (Enebak *et al.*, 1994; Jelkmann *et al.*, 1989; Jordan and Dodds, 1983; Rosner *et al.*, 1983; Valverde y Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1990b). Jordan y Dodds utilizaron TMV dsRNA para preparar sondas marcadas radiactivamente con  $P^{32}$ , que utilizaron con buenos resultados en experimentos de hibridación molecular. También se han preparado sondas mediante etiquetado directo de ARN utilizando dsRNA como materia prima (Valverde *et al.*, 1994). Estas sondas no radiactivas se utilizaron para detectar (*Oryza sativa endornavirus*), *Physalis mottle virus*, *Pepper cryptic virus 1*, y micovirus no identificados del patógeno del cancro del tallo de la soya (*Diaporthe phaseolorum*). Se han utilizado extractos de dsRNA que son transferidos a las membranas para detectar el *Virus del enanismo clorótico del camote* (SPCSV) en (Pio-Ribeiro *et al.*, 1996), *Fiji virus* (Karan *et al.*, 1994), el *Virus satélite del mosaico del tabaco* (Valverde y Dodds, 1986), y un hipovirus 12 kb de *C. parasitica* (Enebak *et al.*, 1994) en ensayos Northern de hibridación.

### PCR en transcripción reversa, clonación y secuenciación

Los dsRNAs se han utilizado para clonar y secuenciar fitovirus y micovirus de ARN (Abougha-

starting material (Valverde *et al.*, 1994). These non-radioactive probes were used to detect *Oryza sativa endornavirus*, *Physalis mottle virus*, *Pepper cryptic virus 1*, and an unidentified mycovirus from the soybean stem canker pathogen (*Diaporthe phaseolorum*). DsRNA extracts blotted onto membranes have been used to detect *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) in (Pio-Ribeiro *et al.*, 1996), *Fiji virus* (Karan *et al.*, 1994), Satellite tobacco mosaic virus (Valverde and Dodds, 1986), and a 12 kb hypovirus from *C. parasitica* (Enebak *et al.*, 1994) in northern hybridization assays.

### Reverse transcription PCR, cloning, and sequencing

Viral dsRNAs have been used to clone and sequence plant and fungal RNA viruses (Aboughanem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; Antoniw *et al.*, 1986; Bar-Joseph *et al.*, 1983; Enebak *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa and Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Okada *et al.* 2011; Rott and Jelkmann, 2001; Jelkmann *et al.*, 1989; Valverde and Sabanadzovic, 2009; Valverde and Sabanadzovic; Valverde *et al.* 1986; 1990; 2011; Zhang and Rowhani, 2000). Virus specific primers have been developed for RT-PCR detection of most plant and fungal viruses reported to date. After heat denaturation, purified viral dsRNA has been used extensively as the template for reverse transcription PCR (RT-PCR) in plant virus testing (Rott and Jelkmann, 2001; Sabanadzovic and Valverde, 2011; Valverde and Sabanadzovic, 2009; Valverde *et al.*, 2011; Tzanetakis *et al.* 2005). Winter *et al.* (1992) and Hoyer *et al.* (1996) characterized *Sweet potato chlorotic stunt virus* using dsRNA as reagent for RT-PCR, cloning, and labeling. Zhang and Rowhani (2000) developed a rapid cDNA cloning method from dsRNA templates to partially characterized grape viruses. Random cDNA clones from CTV

nem-Sabanadzovic *et al.*, 2016; Antoniw *et al.*, 1986; Bar-Joseph *et al.*, 1983; Enebak *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2009; Khalifa y Pearson, 2014; Kim *et al.*, 2005; Okada *et al.* 2011; Rott y Jelkmann, 2001; Jelkmann *et al.*, 1989; Valverde y Sabanadzovic, 2009; Valverde y Sabanadzovic; Valverde *et al.* 1986; 1990; 2011; Zhang y Rowhani, 2000). Se han creado iniciadores según el tipo de virus para detectar mediante RT-PCR la mayoría de los fitovirus y los micovirus reportados a la fecha. Después de someterlo a desnaturalización por calor, el dsRNA viral purificado se ha utilizado extensamente como molde para la transcripción reversa de PCR (RT-PCR) en pruebas con fitovirus (Rott and Jelkmann, 2001; Sabanadzovic y Valverde, 2011; Valverde y Sabanadzovic, 2009; Valverde *et al.*, 2011; Tzanetakis *et al.* 2005). Winter *et al.* (1992) y Hoyer *et al.* (1996) caracterizaron el *Virus del enanismo del camote* utilizando un reactivo para la RT-PCR, la clonación y el etiquetado. Zhang y Rowhani (2000) desarrollaron un método rápido de clonación de cDNA a partir de moldes de dsRNA para caracterizar parcialmente virus de uva. Se obtuvieron clones de cDNA al azar de CTV mediante el uso de dsRNA de tejido de corteza de cítricos purificado y desnaturalizado (Albiach-Martí *et al.*, 2010). La clonación molecular de fitovirus se ha realizado a partir de pequeñas cantidades de dsRNA viral después de purificarlo en gel (Jelkmann *et al.*, 1989). Utilizando dsRNA extraído aplicando el método de De Paulo y Powell (1995), Kunta *et al.* (2007), se realizó la RT-PCR y fue posible detectar, clonar y secuenciar el genoma completo del viroide de los cítricos. De manera similar, De la Torre *et al.* (2009; 2015) detectaron viroides en durazno y aguacate utilizando dsRNA extraído con el método de Valverde *et al.*, (1990), después de realizar la RT-PCR. Este método ha sido particularmente útil cuando se hacen pruebas en plantas que se sabe que producen ARN de baja calidad.

were obtained using denatured viral dsRNA purified from citrus bark tissue (Albiach-Martí *et al.*, 2010). Molecular cloning of plant viruses has been accomplished from small amounts of viral dsRNA after gel purification (Jelkmann *et al.*, 1989). Using dsRNA extracted using the method of De Paulo and Powell (1995), Kunta *et al.* (2007) conducted RT-PCR and were able to detect, clone, and sequence full-length viroids in citrus. Similarly, De la Torre *et al.* (2009; 2015) detected viroids in peach and avocado using dsRNA extracted by the method of Valverde *et al.*, (1990) followed by RT-PCR. This approach has been particularly useful, when testing plants species known to yield low quality ssRNA.

DsRNA extraction and purification has been suggested as an approach to increase viral sequences in sample preparation for NGS (Wu *et al.*, 2015). In a metagenomics study of viruses in environmental samples, Roossinck (2012) used dsRNA-enriched samples and detected high levels of persistent viruses in plants. *De novo* assembly of RNAseq results has been accomplished to identify new species of endornaviruses and mycoviruses (Espach *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2015; Khalifa *et al.*, 2016). Using viral dsRNAs, in combination with deep sequencing, researchers have been able to obtain complete genomic sequences of plant and fungal viruses (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Candresse *et al.*, 2013; Coetzee *et al.*, 2010; Dekker and Parker, 2014; Espach *et al.*, 2012; Quito-Avila *et al.*, 2011; Magae, 2012) and to identify virus-like elements in aquatic microbial populations (Nerva *et al.*, 2016). Deep sequencing from a single grapevine revealed a virome dominated by mycoviruses (Al Rwahnih *et al.*, 2011).

### Field surveys

Surveys of RNA viruses in plants and fungi have been conducted by extracting dsRNAs, analyzing

Se ha sugerido la extracción y purificación de dsRNA como un método para aumentar las secuencias virales en la preparación de muestras de NGS (Wu *et al.*, 2015). En un estudio metagenómico de virus en muestras ambientales, Roossinck (2012) utilizó muestras concentradas con dsRNA viral y detectó altos niveles de virus persistentes en plantas. El ensamble *De novo* comparando con secuencias de genomas de virus disponibles en la base de datos del NCBI ha permitido identificar nuevas especies de endornavirus y micovirus (Espach *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2015; Khalifa *et al.*, 2016). Utilizando dsRNAs virales, en combinación con secuenciación profunda, los investigadores han podido obtener secuencias genómicas completas de fitovirus y micovirus (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Candresse *et al.*, 2013; Coetzee *et al.*, 2010; Dekker y Parker, 2014; Espach *et al.*, 2012; Quito-Avila *et al.*, 2011; Magae, 2012), e identificar elementos que semejan virus en poblaciones microbianas acuáticas (Nerva *et al.*, 2016). La secuenciación profunda de una sola vid reveló un viroma dominado por micovirus (Al Rwahnih *et al.*, 2011).

### Estudios de campo

Estudios de campo de virus ARN en plantas y hongos se han realizado mediante la extracción de dsRNAs, analizándolos en geles de agarosa o poliacrilamida y utilizándolos en RT-PCR y secuenciación. Los dsRNAs, aislados de 44 vides de un viñedo infectado en Sudáfrica, se utilizaron en un análisis de secuenciación profunda, a fin de realizar un censo de la población viral (Al Rwahnih *et al.*, 2011). En estudios de campo de virus de hongos asociados con la planta parásita (*Cuscuta cuspidata*) y su planta huésped (*Ambrosia psilostachya*) en el hábitat de una pradera de hierbas altas en Oklahoma, los investigadores extrajeron dsRNA para detectar micovirus (Feldman *et al.*, 2012). Los



them in agarose or polyacrylamide gels, and using them for RT-PCR and sequencing. DsRNAs, isolated from 44 vines from a diseased South African vineyard, were used in a deep sequencing analysis to build a census of the viral population (Al Rwahnih *et al.*, 2011). In a survey for viruses from fungi associated with a parasitic plant (*Cuscuta cuspidata*) and its host plant (*Ambrosia psilostachya*) in a tallgrass prairie habitat in Oklahoma, researchers extracted dsRNA to detect fungal viruses (Feldman *et al.*, 2012). The detected viruses were further characterized using reverse transcription-PCR and sequence analysis. A survey for endornaviruses in wild plant species of South Louisiana was conducted using a combination of dsRNA extraction and RT-PCR (Rodrigues de Souto *et al.*, 2015). Of 140 species belonging to 58 plant families, seven were found infected with putative endornaviruses. In Mexico, Piedra *et al.*, (2005) conducted surveys to identify viruses infecting a weed *Leonotis nepetifolia* (*Lamiaceae*) commonly present near cultivated fields. Using dsRNA extraction as a complementary tool, the authors were able to identify infections of *Alfalfa mosaic virus* (AMV), CMV, satellite RNA of CMV, and TMV in this plant species. In a survey for viruses infecting tree tobacco in Southern California, electrophoretic analysis of viral dsRNA was used for virus detection (Valverde and Dodds, 1986). Using dsRNA extraction and electrophoretic analysis, Herrero *et al.*, 2009 conducted a survey of mycoviruses in a collection of 103 isolates belonging to 53 different species of endophytic fungi of grasses and detected dsRNA in 12 isolates.

### Plant diseases of unknown etiology

There are several examples of economically important plant diseases of unknown etiology in which the causal agent was elucidated using

virus que se detectaron fueron caracterizados utilizando PCR de transcripción reversa y análisis de secuencia. Se llevó a cabo un estudio de campo de endornavirus en especies de plantas silvestres del sur de Luisiana utilizando una combinación de extracción de dsRNA y RT-PCR (Rodrigues de Souto *et al.*, 2015). De 140 especies pertenecientes a 58 familias de plantas, se encontraron siete infectadas con supuestos endornavirus. En México, Piedra *et al.*, (2005) realizaron estudios de campo para identificar el virus que infecta la maleza *Leonotis nepetifolia* (*Lamiaceae*), comúnmente presente cerca de los campos de cultivo. Utilizando extracción de dsRNA como una herramienta complementaria, los autores identificaron infecciones del *Virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), CMV, ARN satélite de CMV y TMV en dicha especie de plantas. En un estudio de campo de virus que infectan el árbol del tabaco, en el sur de California, se realizaron análisis electroforéticos de dsRNA viral para la detección de virus (Valverde y Dodds, 1986). Mediante extracción de dsRNA y análisis electroforéticos, Herrero *et al.*, 2009 realizaron un estudio de micovirus en una colección de 103 aislamientos pertenecientes a 53 especies diferentes de hongos endofíticos de pastos, y detectaron dsRNA en 12 aislamientos.

### Enfermedades de plantas de etiología desconocida

Existen varios ejemplos de enfermedades de plantas de importancia económica de etiología desconocida en las que el agente causal fue elucidado utilizando dsRNA. El agente causal de la palidosis, una enfermedad de la fresa cuya etiología se desconocía anteriormente, fue identificado como un luteovirus utilizando dsRNA purificado (Tzanetakis *et al.*, 2004; 2005). De manera similar, se determinó que la enfermedad de etiología



dsRNA. The causal agent of pallidosis, a disease of strawberry of previously unknown etiology, was identified to be a luteovirus by using purified dsRNA (Tzanetakis *et al.*, 2004; 2005). Similarly, a disease of unknown etiology affecting Japanese holly fern and leather leaf fern was determined to be caused by a new plant virus species from dsRNA that was used for cloning and sequencing the virus which was later named *Japanese holly fern mottle virus* (Valverde and Sabanadzovic, 2009). Lettuce big vein disease was first shown to be caused by a virus by detection of dsRNAs (Mirkov and Dodds, 1985). In Mexico, the causal agent of a disease of husk tomato (*Physalis ixocarpa*) which consists of foliar yellow mottle was unknown until 2003 when it was confirmed to be AMV by dsRNA analyses (De la Torre *et al.*, 2003).

### Persistent plant viruses

Persistent plant viruses, which are often present in asymptomatic plants, have dsRNA banding profiles that could be confused with that of disease causing acute viruses (Roossinck, 2010; Valverde and Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1990). Persistent plant viruses reported to date belong to the families *Amalgaviridae*, *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Totiviridae*, and *Partitiviridae*, which include members that infect plants and fungi. There is no evidence that these viruses cause disease in plants. The molecular characterization of most persistent plant viruses has been accomplished by starting with genomic or RF dsRNA purification (Fukuhara, 1999; Pfeiffer, 1998; Okada, *et al.*, 2011; 2013; Sabanadzovic and Valverde, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2016; Sabanadzovic *et al.*, 2010; Sabanadzovic *et al.*, 2009). Using a combination of electrophoretic analysis of viral dsRNA and RT-PCR, Khankhum *et al.* (2015) demonstrated that two endornaviruses showed differential infection patterns between gene

desconocida que afecta la hoja del helecho de cuero era causada por una especie nueva de fitovirus. Se utilizó dsRNA para clonar y secuenciar el virus que posteriormente se denominó *Virus del moteado del helecho japonés* (Valverde y Sabanadzovic, 2009). En un principio, mediante la detección de dsRNAs, se descubrió que la enfermedad de las venas grandes de la lechuga era causada por un virus (Mirkov y Dodds, 1985). En México no se conocía el agente causal de la enfermedad de la hoja del tomate (*Physalis ixocarpa*), que consiste en manchas amarillentas en las hojas; fue hasta 2003 cuando mediante análisis de dsRNA se confirmó que era AMV (De la Torre *et al.*, 2003).

### Virus persistentes en plantas

Los virus persistentes en plantas, que suelen estar presentes en plantas asintomáticas, tienen perfiles de bandas de dsRNA que podrían confundirse con los perfiles de virus agudos causantes de enfermedades (Roossinck, 2010; Valverde y Dodds, 1986; Valverde *et al.*, 1990). Los virus persistentes en plantas reportados a la fecha pertenecen a las familias *Amalgaviridae*, *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Totiviridae* y *Partitiviridae*, que incluyen miembros que infectan plantas y hongos. No existe evidencia de que estos virus causen enfermedades en las plantas. La caracterización molecular de muchos de los virus persistentes en plantas se ha realizado a partir de material genómico o purificando RF dsRNA (Fukuhara, 1999; Pfeiffer, 1998; Okada, *et al.*, 2011; 2013; Sabanadzovic y Valverde, 2011; Sabanadzovic *et al.*, 2016; Sabanadzovic *et al.*, 2010; Sabanadzovic *et al.*, 2009). Utilizando una combinación de análisis electroforéticos de dsRNA viral y RT-PCR, Khankhum *et al.* (2015) se demostró que dos endornavirus tenían patrones diferenciales de infección entre los dos centros de domesticación del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). La

pools of common bean (*Phaseolus vulgaris*). The presence of persistent viruses in some crop cultivars and wild plant species emphasizes the importance of including samples from symptomless (assumed to be healthy) plants when using the dsRNA technique to detect and identify acute viruses. The dsRNA profiles of three persistent viruses and nucleic acid extracts from two healthy plants are shown in Figure 6.

presencia de virus persistentes en algunos grupos de cultivos y especies de plantas silvestres destaca la importancia de incluir muestras de plantas asintomáticas (supuestamente sanas) cuando se aplique la técnica dsRNA para detectar e identificar virus agudos. En la Figura 6 se muestran los perfiles de dsRNA de tres virus persistentes y extractos de ácido nucleico de dos plantas sanas.

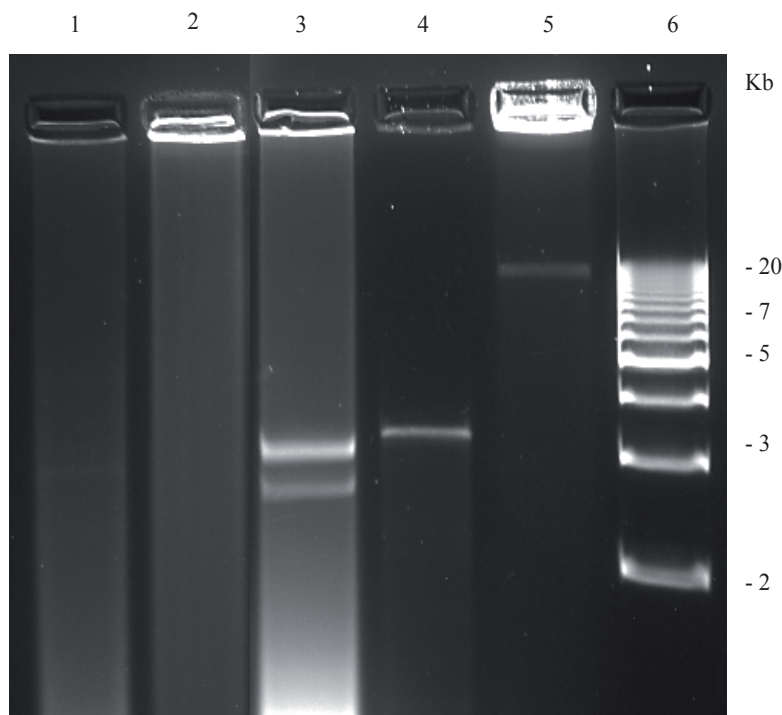


Figure 6. Agarose (1.2%) gelelectrophoresis of dsRNA extracted from symptomless plants. Lane 1, healthy *Phaseolus vulgaris*; lane 2, healthy *Capsicum annuum*; lanes 3-5 plants infected with persistent viruses; lane 3, *Persea americana* infected with a putative chrysovirus; lane 4, *Solanum lycopersicum* infected with Southern tomato virus; lane 5 *Capsicum annuum* infected with Bell pepper endornavirus lane 6 DNA ladder.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de dsRNAs extraídos de plantas asintomáticas. Carril 1, *Phaseolus vulgaris* sana; carril 2, *Capsicum annuum* sana; carriles 3-5 plantas infectadas con virus persistentes; carril 3, *Persea americana* infectada con un supuesto chrysovirus; carril 4, *Solanum lycopersicum* infectado con el Virus sureño del tomate; carril 5 *Capsicum annuum* infectado con endornavirus del pimiento; carril 6 escalera de ADN.

## CONCLUSIONS

Although the cellulose-based protocol for the extraction and purification of viral dsRNA from plants and fungi infected with RNA viruses has been around for over 40 years, it still provides diagnosticians and researchers with a practical tool for the study, detection, and identification of viruses. The simplicity and versatility of the technique, combined with modifications that have improved dsRNA yield, quality, and lowered the overall costs, makes it practical for laboratories with limited resources. As pointed out before, the earlier use of this technique was on the electrophoretic analysis of viral dsRNAs and the use of the banding patterns (electrophoretic profiles) to detect, and in some cases, identify the viruses. However, today, the emphasis is more on the use of viral dsRNA for RT-PCR, cloning, and sequencing which leads to virus identification. It is possible that methods for the extraction of viral dsRNAs will have a place in future implementation of NGS for virus detection and identification. This has been demonstrated with the use of dsRNAs to conduct the complete sequencing of viral RNA genomes from plants and fungi and to identify virus-like elements in aquatic microbial populations using NGS (Nerva *et al.*, 2016), deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Coetzee *et al.*, 2010), and a metagenomics study of environmental samples (Roossinck, 2012).

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to acknowledge the partial support to RAV by research grant No. US-4725-4 F from BARD, the United States-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund and the USDA National Institute of Food and Agriculture.

## CONCLUSIÓN

Aunque el protocolo basado en celulosa para la extracción y purificación de dsRNA viral de plantas y hongos infectados con virus RNA se ha utilizado por más de 40 años, sigue siendo una herramienta práctica para los especialistas en diagnóstico y los investigadores en el estudio, detección e identificación de virus. Dada la simplicidad y versatilidad de la técnica, combinada con modificaciones que han mejorado la producción y la calidad del dsRNA, y disminuido los costos globales, hace que resulte práctica en los laboratorios con pocos recursos. Como se señaló anteriormente, en un principio esta técnica se aplicó en el análisis electroforético de dsRNAs virales y el uso de los patrones de bandas (perfiles electroforéticos) para detectar, y en algunos casos, identificar los virus. Sin embargo, hoy en día, se pone mayor énfasis en el uso de dsRNA viral para RT-PCR, clonación y secuenciación para la identificación de virus. Es posible que los métodos de extracción de dsRNAs virales lleguen a utilizarse en la implementación de NGS para la detección e identificación de virus. Esto ha sido demostrado con el uso de dsRNAs para realizar la secuenciación completa de genomas de RNA de plantas y hongos, e identificar elementos que se parecen virus en poblaciones microbianas acuáticas utilizando NGS (Nerva *et al.*, 2016), análisis de secuenciación profunda de virus que afectan a la vid (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Coetzee *et al.*, 2010), y un estudio metagenómico de muestras ambientales (Roossinck, 2012).

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer el apoyo parcial de RAV mediante la subvención para la investigación No. US-4725-4 F de BARD

## LITERATURE CITED

- Aboughanem-Sabanadzovic N, Tzanetakis IE, Lawrence A, Stephenson RC and Sabanadzovic S. 2016. A novel Ilarvirus is associated with privet necrotic ringspot disease in the Southern United States. *Phytopathology* 106:87-93. DOI: 10.1094/PHYTO-12-14-0387-R
- Akin A, Wu CC and Lin TL. 1998. A comparison of two RNA isolation methods for double-stranded RNA of infectious bursal disease virus. *Journal of Virological Methods* 74:179-184. DOI: 10.1016/S0166-0934(98)00082-2
- Al Rwahnih M, Daubert S, Urbez-Torres JR, Cordero F and Rowhani A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Archives of Virology* 156:397-403. DOI: 10.1007/s00705-010-0869-8
- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Islas C and Rowhani A. 2015. Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology* 105:758-63. DOI: 10.1094/PHYTO-06-14-0165-R
- Albiach-Marti MR, Robertson C, Gowda S, Tatineni S, Belliure B, Garnsey SM, Folimonova SY, Moreno P, and Dawson WO. 2010. The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome. *Molecular Plant Pathology* 11:55-67. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2009.00572.x
- Antoniw JF, Linthorst HJM, White RF and BOL JF. 1986. Molecular cloning of the double-stranded RNA of beet cryptic viruses. *Journal of General Virology* 67:2047-2051. DOI: 10.1099/0022-1317-67-9-2047
- Aramburu J, Navas-Castillo J, Moreno P and Cambra M. 1991. Detection of double-stranded RNA by ELISA and dot immunobinding assay using an antiserum to synthetic polynucleotides. *Journal of Virological Methods* 33:1-11. DOI: 10.1016/0166-0934(91)90002-H
- Atsumi G, Sekine KT and Kobayashi K. 2015. A new method to isolate total dsRNA. *Methods in Molecular Biology* 1236:27-37. DOI: 10.1007/978-1-4939-1743-3\_3
- Azzam OI and Gonsalves D. 1999. Detection of dsRNA from cleistothecia and conidia of the grape powdery mildew pathogen *Uncinula necator*. *Plant Disease* 75:964-967. DOI: 10.1094/PD-75-0964
- Balijja A, Kvarnheden A and Turchetti, T. 2008. A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods* 152:32-37. DOI:10.1016/j.jviromet.2008.06.001
- Bar-Joseph M, Rosner A, Moskovitz M and Hull R. 1983. A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from viral infected plants. *Journal of Virological Methods* 6:1-8. DOI: 10.1016/0166-0934(83)90062-9
- Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J and Mumford R. 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research* 186:20-31. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.007.
- Buck KW. 1999. Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society del Fondo Binacional Estados Unidos-Israel de Investigación y Desarrollo Agrícolas, y al Instituto Nacional de Alimentación y Agricultura de USDA.*

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- B: Biological Sciences 354:613-627. DOI: 10.1098/rstb.1999.0413
- Burgyan J, Grieco F and Russo M. 1989. A defective interfering RNA molecule in cymbidium ringspot virus infections. *Journal of General Virology* 70:235-239. DOI: 10.1099/0022-1317-70-1-235
- Candresse T, Marais A, Faure C and Gentit P. 2013. Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology* 103:293-308. DOI: 10.1094/PHYTO-10-12-0275-R
- Carbonell A, Ángel-Emilio Martínez de Alba A-E, Flores R and Gago S. 2008. Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371:44-53. DOI: 10.1016/j.virol.2007.09.031
- Castanho B, Butler EE and Shepherd RI. 1978. The association of double-stranded RNA with Rhizoctonia decline. *Phytopathology* 68:1515-1519. DOI: 10.1094/Phyto-68-1515
- Castillo A, Cottet L, Castro M and Selpulveda F. 2011. Rapid isolation of mycoviral double-stranded RNA from *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology Journal* 8:38. DOI: 10.1186/1743-422X-8-38
- Chen S, Cao L, Huang Q, Qian Y, and Zhou X. 2016. The complete genome sequence of a novel maize-associated totivirus. *Archives of Virology* 161:487. DOI: 10.1007/s00705-015-2657-y
- Choi GH and Nuss DL. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257:800-803. DOI: 10.1126/science.1496400
- Chu Y-M, Lim WS, Yea SY, Cho JD, Lee YW and Kim KH. 2004. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes* 28:135-143. DOI: 10.1023/B:VIRU.0000012270.67302.35
- Coetzee B, Freeborough MJ, Maree HJ, Celton JM, Rees DJG and Burger JT. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* 400:157-163. DOI: 10.1016/j.virol.2010.01.023
- Condit C and Fraenkel-Conrat H. 1979. Isolation of replicative forms of 3' terminal subgenomic RNAs of tobacco necrosis virus. *Virology* 97:122-30. DOI:10.1016/0042-6822(79)90378-7
- Creamer R and Falk BW. 1989. Characterization of nonspecifically aphid-transmitted aphid CA-RPV isolate of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 79:942-946. DOI: 10.1094/Phyto-79-942
- Dale JL, Phillips DA and Parry JN. 1986. Double-stranded RNA in banana plants with bunchy top disease. *Journal of General Virology* 67:371-375. DOI: 10.1099/0022-1317-67-2-371



- Day PR, Dodds JA, Elliston JE, Jaynes RA and Anagnostakis SI. 1977. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 67:1393-1396. DOI: 10.1094/Phyto-67-1393
- De la Torre AR, Pallas V and Sanchez-Navarro JA. 2016. First report of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and CARNA-5 in carnation in Mexico. *Plant Disease* 100:1509. DOI: org/10.1094/PDIS-01-16-0110-PDN
- De la Torre AR, Sánchez NJ, Pallás V. 2014. Detección del *Prunus necrotic ringspot virus* en durazno (*Prunus persica* (L.) en México y caracterización molecular de su componente ARN-3. *Agrociencia* 48:583-598.
- De la Torre AR, Pallas V and Sanchez-Navarro JA. 2015. First report of *Peach latent mosaic viroid* in peach trees from Mexico. *Plant Disease* 99:899. DOI: org/10.1094/PDIS-01-15-0005-PDN
- De la Torre AR, Salazar-Segura M and Valverde RA. 2003. Etiología del moteado amarillo del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) en México. *Agrociencia* 37:227-289.
- De la Torre AR, Teliz-Ortiz D, Pallas V and Sanchez-Navarro JA. 2009. First report of *Avocado sunblotch viroid* in avocado from Michoacán, México. *Plant Disease* 93:202. DOI: org/10.1094/PDIS-93-2-0202B
- Deker CJ and Parker R. 2014. Analysis of double-stranded RNA from microbial communities identifies double-stranded RNA virus-like elements. *Cell Reports* 7:898-906. DOI: doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.049
- Delye C and Corio-Costet M-F. 1998. Rapid isolation of both double-stranded RNA and PCR-suitable DNA from the obligate biotrophic phytopathogenic fungus *Uncinula necator* using a commercially available reagent. *Journal of Virological Methods* 74:149-153. DOI: 10.1016/S0166-0934(98)00079-2
- Demler SA and de Zoeten GA. 1989. Characterization of a satellite RNA associated with pea enation mosaic virus. *Journal of General Virology* 70:1075-1084. DOI: 10.1099/0022-1317-70-5-1075
- Deng F and Boland GJ. 2004. A satellite RNA of *Ophiostoma novoulmi* mitovirus 3a in hypovirulent isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. *Phytopathology* 94:917-923. DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.11.1407
- DePaulo JJ and Powell CA. 1995. Extraction of double-stranded RNA from plant tissues without the use of organic solvents. *Plant Disease* 79:246-248.
- Derrick KS. 1978. Double-stranded RNA is present in extracts of tobacco plants infected with tobacco mosaic virus. *Science* 199:538-539. DOI: 10.1126/science.622553
- Derrick KS, French RC, Clark CA and Gabriel CJ. 1984. Detection of double-stranded RNA by serologically specific electron microscopy. *Journal of Virological Methods* 9:293-299. DOI: 10.1016/0166-0934(84)90055-7
- Diaz-Ruiz JR and Kaper JM. 1977. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. III. Little nucleotide sequence homology between CARNA 5 and helper RNA. *Virology* 80:204-13. DOI: 10.1016/0042-6822(77)90393-2
- Diaz-Ruiz JR and Kaper JM. 1978. Isolation of viral double-stranded RNAs using LiCl fractionation procedure. *Preparative Biochemistry* 8:1-17. DOI: 10.1080/00327487808068215
- Dickinson MJ and Pryor A. 1989. Isometric virus-like particles encapsidate the double-stranded RNA found in *Puccinia striiformis*, *Puccinia recondita*, and *Puccinia sorghi*. *Canadian Journal of Botany* 67:3420-3425. DOI: 10.1139/b89-417
- Dodds JA. 1982. Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Virology* 118:235-240. DOI: 10.1016/0042-6822(82)90338-5
- Dodds JA and Bar-Joseph M. 1983. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. *Phytopathology* 73:419-423. DOI: 10.1094/Phyto-73-419
- Dodds JA, Morris TJ and Jordan RL. 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* 22:151-168. DOI: 10.1146/annurev.py.22.090184.001055
- Dodds JA, Jarupat T, Lee JG and Roistacher CN. 1987. Effect of host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of Citrus tristeza virus. *Phytopathology* 77:442-447. DOI: 10.1094/Phyto-77-442
- Dodds JA, Valverde RA and Matthews DM. 1988. Detection and interpretation of dsRNAs. Pp 309-326. *In*: Koltin Y and Leibowitz M J (Eds). *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes* Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y. p
- Enebak SA, Hillman BI and Macdonald WL. 1994. A hypovirulent isolate of *Cryphonectria parasitica* with multiple, genetically unique dsRNA segments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:590-595. DOI: 10.1094/MPMI-7-0590
- Espach Y, Maree HJ and Burger JT. 2012. Complete genome of a novel endornavirus assembled from next-generation sequence data. *Journal of Virology* 86:13142. DOI: 10.1128/JVI.02538-12
- Feldman TS, Morsy MR and Roossinck MJ. 2012. Are communities of microbial symbionts more diverse than communities of macrobial hosts? *Fungal Biology* 116:465-477. DOI: 10.1016/j.funbio.2012.01.005
- Franklin RM. 1966. Purification and properties of replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 55:1504-1511.
- Fukuhara T. 1999. Double-Stranded RNA in rice. *Journal of Plant Research* 112:131-138. DOI: 10.1007/PL00013855
- Fukuhara T, Koga R, Aoki N, Yuki C, Yamamoto N, Oyama N, Udagawa T, Horiuchi H, Miyazaki S, Higashi Y, Takeshita M, Ikeda K, Arakawa M, Matsumoto N and Moriyama H. 2006. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. *Archives of Virology* 151:995-1002. DOI: 10.1007/s00705-005-0688-5
- Ghabrial SA, Caston JR, Jiang DH, Nibert ML and Suzuki N. 2015. 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479:356-368. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.034
- German TL and de Zoeten GA. 1975. Purification and properties of replicative form and replicative intermediates of pea enation mosaic virus. *Virology* 66:172-184. DOI: 10.1016/0042-6822(75)90188-9
- Habili N and Kaper JM. 1981. Cucumber mosaic virus-associated RNA5. VII. Double-stranded form accumulation and disease attenuation in tobacco. *Virology* 112:250-261. DOI: 10.1016/0042-6822(81)90630-9



- Hansen DR, Van Alfen NK, Gillies K and Powell WA. 1985. Naked dsRNA associated with hypovirulence of *Endothia parasitica* is packaged in fungal vesicles. *Journal of General Virology* 66:2605-2614. DOI: 10.1099/0022-1317-66-12-2605
- Herrero N, Márquez SS and Zabalgoceazcoa I. 2009. Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. *Archives of Virology* 154:327-330. DOI: 10.1007/s00705-008-0293-5
- Herrero N, Dueñas E, Quesada-Moraga E, and Zabalgoceazcoa I. 2012. Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 78:85238530. DOI: 10.1128/AEM.01954-12. pmid:23001673
- Hillman BI, Foglia R and Yuan W. 2000. Satellite and defective RNAs of *Cryphonectria hypovirus* 3-Grand Haven 2, a virus species in the family *Hypoviridae* with a single open reading frame. *Virology* 276:181-189. DOI:10.1006/viro.2000.0548
- Ho T and Tzanetakis IE. 2014. Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing. *Virology* 471-473:54-60. DOI: 10.1016/j.virol.2014.09.019
- Horiuchi H, Fukuhara T. 2004. Putative replication intermediates in Endornavirus, a novel genus of plant dsRNA viruses. *Virus Genes* 29:365-375. DOI: 10.1007/s11262-004-7441-0
- Hoyer U, Maiss E, Jelkmann W, Lesemann D-E and Vetten J. 1996. Identification of the coat protein of sweet potato sunken vein closterovirus isolate from Kenya and evidence of serological relationship among geographically diverse closterovirus isolates from sweet potato. *Phytopathology* 86: 744-750. DOI: 10.1094/Phyto-86-744
- Huang Q, Baum L and Fu WL. 2010. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory* 56:149-152.
- Jackson AO, Mitchell DM and Siegel A. 1971. Replication of tobacco mosaic virus. I. Isolation and characterization of double-stranded forms of ribonucleic acid. *Virology* 45:182-191. DOI: 10.1016/0042-6822(71)90125-5
- Jelkmann W, Martin RR and Maiss E. 1989. Cloning of four viruses from small quantities of double-stranded RNA. *Phytopathology* 79:1250-1253. DOI: 10.1094/Phyto-79-1250
- Jo Y, Choi H and Cho WK. 2015. *De novo* assembly of a Bell pepper endornavirus genome sequencing RNA sequencing data. *Genome Announcements* 3 no. 2. DOI: 10.1128/genomeA.00061-15
- Jordan RL and Dodds JA. 1983. Hybridization of 5'-end labelled RNA to plant viral RNA in agarose and acrylamide gels. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:33-37.
- Kaper JM and Diaz-Ruiz JR. 1977. Molecular weights of the double-stranded RNAs of cucumber mosaic virus strain S and its associated RNA 5. *Virology* 80:214-17. DOI: 10.1016/0042-6822(77)90394-4
- Karan M, Dale JL, Bateson MF, Harding RM and Teakle DS. 1994. Detection and characterization of pangola stunt Fijivirus from Australia using cloned eDNA probes. *Archives of Virology* 135:397-404. DOI: 10.1007/BF01310023
- Khankhum S, Escalante C, Rodrigues de Souto E, De la Torre R and Valverde RA. 2015. A method for the extraction of viral double stranded RNA from relative small amounts of virus and fungus infected plant tissues. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:S 223 (Suplemento).
- Khalifa ME and Pearson MN. 2014. Molecular characterization of an endornavirus infecting the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Research* 189:303-309. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.06.010
- Khalifa ME, Varsani A, Ganley AR and Pearson MN. 2016. Comparison of Illumina de novo assembled and Sanger sequenced viral genomes: A case study for RNA viruses recovered from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Research* 219:51-57. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.11.001
- Kim Y-J, Park S-H, Yie S-W and Kim K-H. 2005. RT-PCR Detection of dsRNA Mycoviruses Infecting *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus blazei* Murrill. *The Plant Pathology Journal* 21:343-348. DOI: 10.5423/PPJ.2005.21.4.343
- Klein A and Reichman ME. 1970. Isolation and characterization of two species of double-stranded RNA from tobacco leaves doubly infected with tobacco necrosis and satellite tobacco necrosis viruses. *Virology* 42:269-72. DOI: 10.1016/0042-6822(70)90268-0
- Kondo H, Hisano S, Chiba S, Maruyama K, Andik IB, Toyoda K, Fujimori F and Suzuki N. 2016. Sequence and phylogenetic analyses of novel totivirus-like double-stranded RNAs from field-collected powdery mildew fungi. *Virus Research* 213:353-364. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.11.015 0168-1702
- Kousik CS, Snow JP and Valverde RA. 1994. Comparison of double-stranded RNA components and virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and AG-1 IB. *Phytopathology* 84:44-49. DOI: 10.1094/Phyto-84-44
- Kovalskaya N and Hammond RW. 2014. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Science* 228:48-60. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.05.006
- Kunta M, da Graça JV and Skaria M. 2007. Molecular detection and prevalence of citrus viroids in Texas. *HortScience* 42:600-604.
- Kwon S-J, Lim W-S, Park S-H, Park M-R and Kim K-H. 2007. Molecular characterization of a dsRNA mycovirus, *Fusarium graminearum* virus-DK21, which is phylogenetically related to Hypoviruses but has a genome organization and gene expression strategy resembling those of plant potex-like viruses. *Molecules and Cells* 23:304-315. DOI: 10.1007/s10059-009-0112-1
- Lee SH, Moon BJ and Lee JK. 2006. Characteristics of hypovirulent strains of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, isolated in Korea. *Mycobiology* 34:61-66. DOI: 10.4489/MYCO.2006.34.2.061
- Li W, Zhang T, Sun H, Deng Y, Zhang A, Chen H and Wang K. 2014. Complete genome sequence of a novel endornavirus in the wheat sharp eyespot pathogen *Rhizoctonia cerealis*. *Archives of Virology* 159:1213-1216. DOI: 10.1007/s00705-013-1893-2
- Libonati M and Sorrentino S. 1992. Revisiting the action of bovine ribonuclease A and pancreatic-type ribonucleases

- on double-stranded RNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 117:139-151. DOI: 10.1007/BF00230753
- Libonati M, Casarna N and Furia A. 1980. Double-stranded RNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 31:147-164. DOI: 10.1007/BF00225848
- Liu L, Wang Q, Cheng J, Fu Y, Jiang D and Xie J. 2015. Molecular characterization of a bipartite double-stranded RNA virus and its satellite-like RNA co-infecting the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Microbiology* 6:406. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00406
- Li L, Liu J, Xu A, Wang T, Chen J and Zhu X. 2013. Molecular characterization of a trisegmented chrysovirus isolated from the radish *Raphanus sativus*. *Virus Research* 176:169-78. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.06.004
- Magae Y. 2012. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*. *Virology Journal* 9:60. DOI: 10.1186/1743-422X-9-60
- Miller WA and Koev G. 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 273:1-8. DOI:10.1006/viro.2000.0421
- Mirkov TE and Dodds JA. 1985. Association of double-stranded ribonucleic acids with lettuce big vein disease. *Phytopathology* 75:631-635. DOI: 10.1094/Phyto-75-631
- Morris TJ and Dodds JA. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858. DOI: 10.1094/Phyto-69-854
- Nerva L, Ciuffo M, Vallino M, Margaria P, Varese GC, Gnani G and Turina M. 2016. Multiple approaches for the detection and characterization of viral and plasmid symbionts from a collection of marine fungi. *Virus Research* DOI: 10.1016/j.virusres.2015.10.028
- Nuss DL and Koltin Y. 1990. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 28:37-58. DOI: 10.1146/annurev.py.28.090190.000345
- Okada R, Kiyota E, Moriyama H, Fukuhara T and Natsuaki T. 2015. A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *Journal of General Plant Pathology* 81:103-107. DOI 10.1007/s10327-014-0575-6
- Okada R, Young CK, Valverde RA, Sabanadzovic S, Aoki N, Hotate S, Kiyota E, Moriyama H and Fukuhara T. 2013. Molecular characterization of two evolutionally distinct endornaviruses co-infecting common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of General Virology* 93:220-229. DOI 10.1099/vir.0.044487-0
- Okada R, Kiyota E, Sabanadzovic S, Moriyama H, Fukuhara T, Saha P, Roossinck MJ, Severin A and Valverde RA. 2011. Bell pepper endornavirus: molecular and biological properties and occurrence in the genus *Capsicum*. *Journal of General Virology* 92:2664-2673. DOI 10.1099/vir.0.034686-0
- Osman TAM and Buck KW. 1990. Double-stranded RNAs isolated from plant tissue infected with red clover necrotic mosaic virus correspond to genomic and subgenomic single-stranded RNAs. *Journal of General Virology* 71:945-948. DOI: 10.1099/0022-1317-71-4-945
- Pathak KB and Nagy PD. 2009. Defective interfering RNAs: foes of viruses and friends of virologists. *Viruses* 1:895-919 DOI: 10.3390/v1030895
- Pecina V, Alvarado MJ, Williams H, De la Torre RA and Vandemark GJ. 2000. Detection of double-stranded RNA in *Macrophomina phaseolina*. *Mycologia* 92:900-907. DOI: 10.2307/3761586
- Piedra IE, De la Torre AR, Zuñiga G, Xoconostle CB and Ruiz MR. 2005. *Leonotis nepetifolia*: An important plant virus reservoir in central Mexico. *Phytoparasitica* 33: 480-494. DOI: 10.1007/BF02981397
- Pfeiffer P. 1998. Nucleotide sequence, genetic organization, and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *Journal of General Virology* 79:2349-2358. DOI: 10.1099/0022-1317-79-10-2349
- Quito-Avila DF, Jelkmann W, Tzanetakis I, Keller K and Martin RR. 2011. Complete sequence and genetic characterization of *Raspberry latent virus*, a novel member of the family *Reoviridae*. *Virus Research* 155:397-405. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.11.008
- Reyes PN, Marbán MN, Delgado SF y De la Torre AR. 2003. Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* BERK. y su relación con ARN de cadena doble. *Agrociencia* 37:495-502.
- Rodrigues de Souto E, Escalante C and Valverde RA. 2015. Detection of plant endornaviruses in wild plants of south Louisiana. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:S 224 (Suplemento).
- Romanos MA, Buck KW and Rawlinson CJ. 1981. A satellite double-stranded RNA in a virus from *Gaeumannomyces graminis*. *Journal of General Virology* 57:375-385. DOI: 10.1099/0022-1317-57-2-375
- Roossinck MJ. 2012. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annual Review of Genetics* 46, 359-369. DOI: 10.1146/annurev-genet-110711-155600
- Roossinck MJ. 2010. Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365:1899-1905. DOI: 10.1098/rstb.2010.0057
- Rosner A, Bar-Joseph M, Moscovitz M and Mevarech M. 1983. Diagnosis of specific viral RNA sequences in plant extracts by hybridization with a polynucleotide kinase-mediated <sup>32</sup>P,- labeled double-stranded RNA probe. *Phytopathology* 73:699-702. DOI: 10.1094/Phyto-73-699
- Rott ME and Jelkmann W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107:411-420. DOI: 10.1023/A:1011264400482
- Sabanadzovic S and Valverde RA. 2011. Properties of two cryptoviruses from pepper (*Capsicum annum*). *Virus Genes* 43:307-312. DOI: 10.1007/s11262-011-0634-4
- Sabanadzovic S, Ghanem-Sabanadzovic A and Valverde RA. 2010. Novel monopartite dsRNA virus from rhododendron. *Archives of Virology* 155:1859-1863. DOI: 10.1007/s00705-010-0770-5
- Sabanadzovic S, Wintermantel WM, Valverde RA, McCreight JD and Aboughanem-Sabanadzovic N. 2016. *Cucumis melo* endornavirus: Genome organization, host range and co-divergence with the host. *Virus Research* 214:49-58. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.01.001
- Sabanadzovic S, Valverde RA, Brown JK, Martin RR and Tzanetakis IE. 2009. Southern tomato virus: the link

- between the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. *Virus Research* 140:130-137. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.11.018
- Shamoun SF, Varga A, Valverde RA, Ramsfield T, Sumampong G, Elliott M, Masri S and James D. 2008. Identification and molecular characterization of a new dsRNA virus infecting *Chondrostereum purpureum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30:604-613. DOI: 10.1080/07060660809507561
- Schonborn J, Oberstra J, Breyel BE, Tittgen J, Schumacher J and Lukacs N. 1991. Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucleic Acids Research* 19:2993-3000. DOI: 10.1093/nar/19.11.2993
- Tzanetakis IE, Halgren GB, Keller KE, Hokanson SC, Maas JL, McCarthy PL and Martin RR. 2004. Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease. *Plant Disease* 88:383-390. DOI: 10.1094/PDIS.2004.88.4.383
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2008. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. *Journal of Virological Methods* 149:167-70. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.01.014
- Tzanetakis IE, Keller KE and Martin RR. 2005. The use of reverse transcriptase for efficient first-and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. *Journal of Virological Methods* 124:73-77. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.11.006
- Valverde RA and Dodds JA. 1986. Evidence for a satellite RNA associated naturally with the U5 strain and experimentally with the U1 strain of tobacco mosaic virus. *Journal of General Virology* 67:1875-1884. DOI: 10.1099/0022-1317-67-9-1875
- Valverde RA and Glascock CB. 1991. Further examination of the RNA and coat protein of spring beauty latent virus. *Phytopathology* 81:401-404. DOI: 10.1094/Phyto-81-401
- Valverde RA and Sabanadzovic S. 2009. A new plant virus with unique properties infecting Japanese holly fern. *Journal of General Virology* 90:2542-2549. DOI: 10.1099/vir.0.012674-0
- Valverde RA, Arancibia RA and Can F. 1994. Nonradioactive probes by direct labelling of ssRNA from dsRNA. *BioTechniques* 17:70-72.
- Valverde RA, Black LL and Dufresne DJ. 1995. A comovirus affecting Tabasco pepper in Central America. *Plant Disease* 79:421-423. DOI: 10.1094/PD-79-0421
- Valverde RA, Dodds JA and Heick JA. 1986. Double stranded RNAs from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* 76:459-465. DOI: 10.1094/Phyto-76-459
- Valverde RA, Nameth ST and Jordan RL. 1990a. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74:255-258. DOI: 10.1094/PD-74-0255
- Valverde RA, Sabanadzovic S and Rush MC. 2011. Identification of *Oryza sativa endornavirus* in rice genotypes from breeding programmes in the United States. *Plant Breeding* 130:271-274. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2010.01778.x
- Valverde RA, Nameth ST, Abdalha AO, Desjardins PR and Dodds JA. 1990b. Indigenous double-stranded RNA from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Science* 67:195-201. DOI: 10.1016/0168-9452(90)90243-H
- Ward LI, Delmiglio C, Hill CF and Clover GRG. 2009. First report of Tobacco ringspot virus on *Sophora microphylla*, a native tree of New Zealand. *Plant Pathology* 58:784. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02125.x
- Wei CZ, Osaki H, Iwanami T, Matsumoto N and Ohtsu Y. 2003. Molecular characterization of dsRNA segments 2 and 5 and electron microscopy of a novel reovirus from a hypovirulent isolate, W370, of the plant pathogen *Rosellinia necatrix*. *Journal of General Virology* 84:2431-2437. DOI: 10.1099/vir.0.19098-0
- Winter S, Purac A, Leggett F, Frison EA, Rossel HW and Hamilton RI. 1992. Partial characterization and molecular cloning of a closterovirus from sweet potato infected with the sweet potato virus disease complex from Nigeria. *Phytopathology* 82:869-875. DOI: 10.1094/Phyto-82-869
- Wu Q, Ding S-W, Zhang Y and Zhu S. 2015. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology dependent and homology independent algorithms. *Annual Review of Phytopathology* 53:425-44. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120030
- Zelcer A, Weaber KF, Balazs E and Zaitlin M. 1981. The detection and characterization of viral related double-stranded RNAs in tobacco mosaic virus infected plants. *Virology* 113:417-427. DOI: 10.1016/0042-6822(81)90171-9
- Zhang YP and Rowhani A. 2000. A strategy for rapid cDNA cloning from double-stranded RNA templates isolated from plants infected with RNA viruses using Taq DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 84:59-63. DOI: 10.1016/S0166-0934(99)00126-3