

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION ESTUDIOS DE POST-GRADO



VIROIDES DE LOS CITRICOS: IMPLEMENTACION DE
TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION Y
DETERMINACION DE INFECCION NATURAL
EN EL CAMPO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGIA

POR:

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

San Nicolás de los Garza, N. L., México Octubre de 1998

OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

TD
QR500
A4
c.1



1080087067

14662

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**IMPLEMENTACION DE
TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION Y
DETERMINACION DE INFECCION NATURAL EN EL CAMPO**
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

TESIS

DE M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGIA**

POR

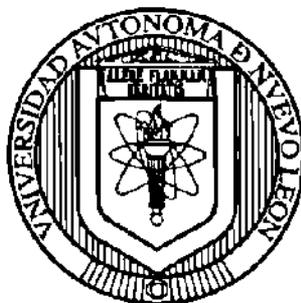
[Handwritten signature]

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ





**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**VIROIDES DE LOS CITRICOS: IMPLEMENTACION DE
TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION Y
DETERMINACION DE INFECCION NATURAL EN EL CAMPO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dr. Mario A. Rocha Peña
Director de Tesis

Dr. Juan Pablo Martínez Soriano
Co-director

Dr. Benito Pereyra Alférez
Asesor

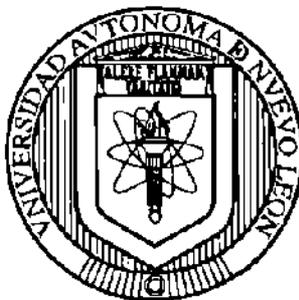
Dr. Rafael Rivera Bustamante
Asesor

Dr. Richard F. Lee
Asesor

Dra. Ma. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

Handwritten signatures of the thesis committee members on horizontal lines.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**VIROIDES DE LOS CITRICOS: IMPLEMENTACION DE
TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION Y
DETERMINACION DE INFECCION NATURAL EN EL CAMPO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

COMISION DE EXAMEN

Dr. Mario Alberto Rocha Peña
Presidente

Dr. Benito Pereyra Alférez
Secretario

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Vocal

San Nicolás de los Garza, N. L., México

Octubre de 1998

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Biografía del autor	IV
Abreviaturas y simbología	V
Lista de Cuadros	VII
Lista de Figuras	IX
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCION	
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivos	2
II. REVISION DE LITERATURA	
2.1 Identidad de los viroides	3
2.2 Ocurrencia, distribución e importancia en la agricultura	3
2.3 Caracterización	5
2.4 Viroides causantes de enfermedades en cítricos	5
2.4.1 Exocortis	6
2.4.2 Cachexia o xiloporosis	7
2.4.3 Otros viroides de cítricos	9
2.5 Extracción del RNA	11
2.5.1 Cromatografía del RNA en celulosa (CF-11)	11
2.6 Detección de viroides	11
2.6.1 Bioensayos en plantas indicadoras	12
2.6.2 Análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	12
2.6.3 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	13
2.6.4 Hibridación de ácidos nucleicos	13

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Fuente de viroides y material vegetal	16
3.2 Extracción del RNA.....	19
3.2.1 Cuantificación de la cantidad y calidad del RNA.....	22
3.3 Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida	23
3.3.1 Establecimiento de la técnica.....	23
3.3.2 Comparación de métodos de extracción del RNA en la detección directa.....	27
3.3.3 Validación de la técnica.....	27
3.4 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa	27
3.4.1 Selección, análisis y síntesis de iniciadores (primers).....	27
3.4.2 Establecimiento de las condiciones de reacción para el viroide cachexia.....	28
3.4.3 Establecimiento de las condiciones de reacción para el viroide exocortis	30
3.4.4 Validación de la técnica.....	30
3.5 Ensayo de hibridación por mancha de punto (dot blot)	30
3.6 Bioensayos de transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad	30

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Extracción del RNA.....	32
4.2 Análisis del RNA por electroforesis en geles de poliacrilamida.....	37
4.2.1 Establecimiento de la técnica.....	37
4.2.2 Comparación de métodos de extracción del RNA para la detección directa de viroides por electroforesis secuencial (sPAGE).....	39
4.3 RT-PCR.....	42
4.3.1 Cachexia	42
4.3.2 Exocortis	45
4.4 Hibridación molecular.....	45
4.5 Transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad.....	47
4.6 Validación integrada de técnicas moleculares en diversos hospedantes	49
4.6.1 Naranja dulce de Nuevo León.....	49
4.6.2 Limón Persa de Tabasco	52

	Pág.
4.6.3 Limón Persa de Yucatán.....	54
4.6.4 Limón Persa de Tamaulipas y Veracruz	57
V. CONTRIBUCIONES Y RELEVANCIA	60
VI. CONCLUSIONES	62
VII. LITERATURA CITADA.....	63
VIII. APENDICE	
8.1 Selección, análisis y dilución de iniciadores para la detección del viroide cachexia	74
8.1.1 Selección de iniciadores y simulación de PCR	74
8.1.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO	76
8.1.3 Temperaturas de apareamiento (Tm) estimadas con el programa OLIGO	77
8.1.4 Características de dilución de los iniciadores	78
8.2 Selección, análisis y dilución de iniciadores para la detección del viroide exocortis.....	80
8.2.1 Selección de iniciadores y simulación de PCR	80
8.2.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO	81
8.2.3 Temperaturas de apareamiento (Tm) estimadas con el programa OLIGO	83
8.2.4 Características de dilución de los iniciadores	84
8.3 Mapa gráfico de restricción de los viroides cachexia y exocortis de los cítricos.....	86

DEDICATORIA

*A mi esposa,
Teresa Segura Flores*

*A mis hijos,
Omar Marco
Irvin Alejandro*

*A la memoria de mis padres,
Jose Pablo Alvarado Torres
Ma. del Socorro Gomez de Alvarado*

AGRADECIMIENTOS

A La Facultad de Agronomía de la UANL, por ésta gran oportunidad de superación académica; a su director el Ing. Cesareo Guzmán Flores, por todo su apoyo en la etapa final de mis estudios de Doctorado.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por su aceptación al Programa de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología, en especial al Dr. Luis J. Galán Wong, coordinador de este Programa.

A la Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular del Convenio INIFAP-UANL, que mediante sus laboratorios de Virología Vegetal y Patología Molecular, me permitieron la capacitación y realización del trabajo de investigación. Al M.C. Jorge Cantú Vega, Director de Coordinación y Vinculación del INIFAP en el estado de Nuevo León.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca-crédito otorgada para manutención durante el período de estudios.

Al Dr. Mario Alberto Rocha Peña, por sus sabias enseñanzas, por todas las facilidades concedidas en su laboratorio y en la red nacional de cítricos del INIFAP que preside, por su comprensión en los errores cometidos y sobre todo por su acertada dirección.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano, quién despertara en mí el interés por ésta interesante área del conocimiento, por su ejemplo de dinamismo, y por abrirme las puertas de su laboratorio, de su conocimiento y de su amistad.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, por sus enseñanzas durante el doctorado y por haber aceptado formar parte del comité de tesis.

Al Dr. Rafael Rivera Bustamante, del CINVESTAV-Unidad Irapuato, por su disponibilidad para colaborar en este proyecto.

Al Dr. Richard F. Lee, de la Universidad de Florida en E.U., por la amable donación de los materiales biológicos y otras facilidades otorgadas.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño y a la Dra. Lilia Hortencia Morales, por aceptar participar como miembros del examen de grado.

Al M.C. Nabor González Garza, por su buena disposición.

Al Dr. Pablo Zapata Benavidez, Dr. Juan Manuel Alcocer, Dra. Diana Sara Leal y M.C. Magdalena Iracheta Cárdenas, por la capacitación, apoyo y sugerencias al trabajo de laboratorio.

A todas aquellas personas como el Ing. Pablo Ruiz Beltrán, M.C. Juan Jasso, M.C. Sergio Silva Vara, y otros, que de manera anónima colaboraron en este proyecto realizando los muestreos en localidades.

A mis compañeros de laboratorio, Alberto Morales, Humberto Almeyda, Ma. Irene Avila, Norma Patricia Cázares, Eleazar Moreno, Leobardo Iracheta, Edgar Gallardo, Elisa María, Olga Isadora, Irma Olivia, Tomás Rangel y Sra. Mirthala Páez.

Se agradece el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto a las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyecto 4030N

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Fundación Produce Nuevo León

Fundación Mexicana para la Investigación Científica

BIOGRAFIA DEL AUTOR



El autor de este trabajo nació en la ciudad de Monterrey el 12 de diciembre de 1961. Está casado con Teresa Segura Flores y tienen 2 hijos: Omar Marco de 7 años e Irvin Alejandro de apenas 1 año. Estudió la carrera de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en la Facultad de Agronomía de la UANL (FAUANL) durante el período comprendido entre los años 1977-1982. De 1983 a 1986 fue Maestro Ordinario y Auxiliar de Investigación en Mejoramiento Genético de Maíz en la FAUANL; posteriormente, de 1986 a 1990 realizó estudios de Maestría en Ciencias con especialidad en Genética en el Centro de Genética del Colegio de Postgraduados ubicado en Montecillo, estado de México. En 1990 se reincorporó a sus actividades de docencia e investigación en la FAUANL hasta 1994, año en que ingresó al Programa de Doctorado en Ciencias en la especialidad de Biotecnología, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, concluyendo su investigación satisfactoriamente 4 años después.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

AMV	Transcriptasa inversa obtenida del Virus Mieloblastosis Aviar
aprox.	Aproximadamente
cat.	Catálogo
CCaVd	Viroide causante de cachexia en los cítricos
CCaVdc	Forma circular del viroide causante de cachexia en los cítricos
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CEGET	Campo Experimental General Terán
CEVd	Viroide causante de exocortis en los cítricos
CEVdc	Forma circular del viroide causante de exocortis en los cítricos
CF-11	Celulosa
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
Comp.	Complementario
cRNA	RNA complementario
cv	Cultivar
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleósidos trifosfatados
dPAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
E.U.	Estados Unidos de América
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
Fig.	Figura
g	Gramos
GPS	Solución amortiguadora a base de glicina, fosfato de sodio y cloruro de sodio
ha	Hectáreas
<i>Hinf</i> I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-G↓ANTC
Homó.	Homólogo
IBPGR	Consejo Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
JA-20	Modelo del rotor para centrifuga
kcal	Kilocalorías
km	Kilómetro
M	Concentración molar o molaridad
m	Marcador de peso molecular
mA	Miliamperios
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
M-MLV	Transcriptasa inversa obtenida del Virus de la Leucemia Murina de Moloney
Na ₂ EDTA	Acido etilendiaminotetracético, sal disódica
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetros
nM	Concentración nanomolar
nmoles	Nanomoles
No.	Número
Pág.	Página
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pg	Picogramos
pH	Potencial hidrógeno
PM	Peso molecular
pmoles	Picomoles
repe	Repetición
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SLS	Sarcosina lauril de sodio
sPAGE	Electroforesis secuencial
STE	Solución amortiguadora a base de tris, cloruro de sodio y Na ₂ EDTA
TAE	Solución amortiguadora a base de tris, acetato de sodio y Na ₂ EDTA
Taq	Enzima termoestable que polimeriza DNA, proviene de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Solución amortiguadora a base de tris, ácido bórico y Na ₂ EDTA
Tm	Temperatura de apareamiento
Tris	TRIZMA® Base. Tris[Hidroximetil]aminometano
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UDO	Unidades de densidad óptica
USA	Estados Unidos de América, siglas en idioma inglés
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VTC	Virus Tristeza de los Cítricos
v/v	Volumen/volumen
X	Número de veces con respecto a la concentración original
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración micromolar
°C	Grados Celsius
%	Por ciento (medida de cantidad)
'	Minutos (medida de tiempo)
"	Segundos (medida de tiempo)
4S, 5S, 7S, 18S, 28S	Acidos ribonucleicos ribosomales con coeficientes de sedimentación 4, 5, 7, 18 y 28
1a.	Primera
2a.	Segunda

LISTA DE CUADROS

No.	Descripción	Pág.
1.	Descubrimiento cronológico de viroides	4
2.	Variantes conocidas del viroide exocortis de los cítricos	7
3.	Variantes conocidas del viroide enanismo del lúpulo	8
4.	Catálogo consenso de viroides de cítricos	9
5.	Transmisión e intensidad sintomatológica de viroides de cítricos en especies herbáceas	10
6.	Especies vegetales utilizadas para la detección y transmisión de RNAs patogénicos de plantas	16
7.	Colectas de limón Persa y naranjo dulce efectuadas en diferentes localidades	17
8.	Soluciones necesarias para la preparación de geles nativos de poliacrilamida al 5% (A) y al 7% desnaturalizante con urea 8 M (B) dependiente del volumen a utilizar	24
9.	Rendimiento estimado del RNA total ($\mu\text{g g}^{-1}$) extraído de corteza y hojas de cítricos por 5 métodos	32
10.	Relación de absorbancias 260/280 nm obtenidas en RNA extraído de corteza y hojas de cítricos por 5 métodos	34
11.	Transmisión de viroides a diferentes especies vegetales a partir de RNA total, RNA viroidal y yemas de limón Persa	49

No.	Descripción	Pág.
12.	Detección de viroides por sPAGE y RT-PCR a partir de RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en los estados de Tamaulipas y Veracruz	57
13.	Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide cachexia y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify	75
14.	Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide exocortis y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify	81

LISTA DE FIGURAS

No.	Descripción	Pág.
1.	Esquema general del procedimiento realizado para la implementación y validación de técnicas moleculares de detección de viroides en cítricos	15
2.	Esquema con las características de la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 5% (1a. dirección)	25
3.	Esquema con las características de la electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con urea 8 M (2a. dirección)	26
4.	RNA obtenido por 5 métodos de extracción a partir de corteza de cidra Etrog visualizado en un gel de agarosa al 0.8%	35
5.	Electroforesis secuencial en un gel de poliacrilamida al 7% desnaturalizante (urea 8 M) con aislamientos de viroides semipurificados	38
6.	Comparación de 5 métodos de extracción del RNA en la sensibilidad de detección del viroide exocortis en un gel de poliacrilamida al 7% desnaturalizante (urea 8 M)	40
7.	Amplificación del cDNA del viroide cachexia visualizado en un gel de agarosa al 1.3%	43
8.	Amplificación del cDNA del viroide cachexia sintetizado a partir de diferentes concentraciones de RNA y visualizado en un gel de poliacrilamida al 5%	44
9.	Reacción de hibridación para el viroide tubérculo fusiforme de la papa con RNA extraído de cidra Etrog por 5 métodos	46

No.	Descripción	Pág.
10.	Separación en un gel de agarosa al 0.8% del RNA obtenido de muestras de naranjo dulce de un lote de variedades tempranas del CEGET, N.L.	49
11.	Separación del RNA obtenido de muestras de naranjo dulce en un gel de poliacrilamida nativo al 5%	50
12.	Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de árboles de naranjo dulce del lote de variedades tempranas colectadas en el CEGET, N.L.	51
13.	Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para exocortis en 7 muestras de naranjo dulce	52
14.	Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco	53
15.	Amplificación enzimática con iniciadores específicos para exocortis del RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco	53
16.	Amplificación enzimática con iniciadores específicos para cachexia del RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco	54
17.	Electroforesis secuencial del RNA extraído de 5 muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán	55
18.	Amplificación enzimática del cDNA de los viroides exocortis y cachexia en muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán	55
19.	Electroforesis secuencial del RNA extraído de 8 muestras de limón Persa de la 2a. colecta en Yucatán	56

No.	Descripción	Pág.
20.	Amplificación enzimática del cDNA de los viroides exocortis (A) y cachexia (B) en muestras de limón Persa de la 2a. colecta en Yucatán	56
21.	Síntomas asociados con infección por viroides en limón Persa y pepino	59
22.	Simulación de amplificación por PCR del viroide cachexia utilizando la accesión U02527 como secuencia molde, los iniciadores HSV y el programa Amplify	74
23.	Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide cachexia	79
24.	Simulación de amplificación por PCR del viroide exocortis utilizando la accesión U21126 como secuencia molde, los iniciadores CEV y el programa Amplify	80
25.	Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide exocortis	85
26.	Mapa gráfico de restricción del viroide cachexia simulado con el programa DNA Strider	86
27.	Mapa gráfico de restricción del viroide exocortis simulado con el programa DNA Strider	86

RESUMEN

El diagnóstico rutinario de las enfermedades exocortis y cachexia de los cítricos se ha realizado en México mediante bioensayos en plantas indicadoras, cidra Etrog para exocortis y mandarina Parson's Special para cachexia; sin embargo, este método de detección es lento y requiere condiciones estrictas de temperatura así como amplio espacio en invernaderos. Debido a la necesidad de tener métodos rápidos y sensibles para determinar la sanidad de los árboles, se planteó el presente trabajo con el objetivo general de implementar metodologías moleculares para la detección de viroides, y su aplicación en la identificación de los viroides causantes de las enfermedades exocortis y cachexia de los cítricos. Después de probar diferentes factores involucrados en la separación y tinción del RNA en geles de poliacrilamida, se estableció la técnica de electroforesis secuencial (sPAGE) para la detección de los viroides exocortis (CEVd) y cachexia (CCaVd). Al comparar 5 métodos de extracción del RNA para la detección directa del viroide exocortis por sPAGE, no se encontró diferencia entre éstos, lográndose resultados satisfactorios con los 5 métodos probados; sin embargo, el método de Lee (1995) mostró superioridad en la cantidad de RNA total obtenido. Por otra parte, se establecieron las condiciones de reacción para la amplificación del DNA complementario a las secuencias de los viroides exocortis y cachexia a partir de testigos semipurificados y RNA extraído de plantas indicadoras. Se obtuvieron mejores resultados con un proceso de RT-PCR desacoplado o discontinuo obteniéndose un producto de 300 pb aproximadamente y una sensibilidad de 100 ng de RNA total en el caso de CCaVd; y un producto de 370 pb en el caso de CEVd. En ambos casos no se observó amplificación con RNA extraído de testigos sanos. Se validaron las técnicas sPAGE y RT-PCR con muestras de huertos comerciales de limón Persa colectadas en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán, así como un lote de variedades de naranja dulce en el estado de Nuevo León, lográndose la detección de ambos viroides (CEVd y CCaVd) por RT-PCR en plantas de limón Persa con diferentes niveles de síntomas, pero por sPAGE sólo fue posible detectar CEVd en las mismas muestras. Los viroides CEVd y CCaVd detectados en naranja dulce y limón Persa fueron transmitidos a tomate, pepino, naranja agrio, naranja dulce Pineapple, mandarina Cleopatra, citrange Troyer y cidra Etrog, comprobándose la infectividad de dichos patógenos. Los resultados obtenidos indican que las 2 técnicas establecidas (sPAGE y RT-PCR) son complementarias para la detección efectiva y segura de los viroides CEVd y CCaVd.

ABSTRACT

In Mexico, the current method for diagnosing citrus exocortis and cachexia diseases is by reactions on indexing hosts, Etrog citron for exocortis and Parson's Special mandarin for cachexia. However, this method of detection is slow and require strict control of temperature and space in greenhouse. Due necessity in to have speed and sensitive methods for tree health determination, the general objective of this work was implementing molecular methods for viroids detection and its application to identifying the viroids causing citrus exocortis and cachexia diseases. After trying different factors affecting RNA separation and polyacrylamide gels staining, the sequential polyacrylamide gels electrophoresis technique (sPAGE) for detection of exocortis (CEVd) and cachexia viroids (CCaVd) was established. After comparing five methods of RNA isolation for direct detection of exocortis viroid by sPAGE, there were no differences between those. Satisfactories results had obtained with all five testing methods, however, Lee (1995) method overcome the others in quantity of total RNA. Otherwise, reaction conditions for the amplification of complemetary DNA to sequences of the exocortis and cachexia viroids were established from semipurified controls and RNA getting from indicator plants. Better results were obtained with a disacoupled process of RT-PCR obtaining a 300 base pair (bp) fragment and a sensitivity of 100 ng of total RNA in the case of CCaVd, and a 370 bp fragment with CEVd. In both cases no amplification signs were observed when using RNA isolated from healthy controls. In the validity tests of sPAGE and RT-PCR techinques with Persian lime samples from field trees colected in Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, and Yucatán states, and an orchard of orange cultivars in Nuevo León, both viroids (CEVd and CCaVd) were found by RT-PCR in Persian lime in most of the samples with different levels of symptoms, but only CEVd was detected in the same samples by sPAGE. CEVd and CCaVd viroids from sweet orange and Persian lime were transsmited to tomato, cucumber, sour orange, sweet orange Pineapple, Cleopatra mandarin, Troyer citrange, and Etrog citron, for verifying the infectivity of pathogens. The results obtained suggests that both techinques (sPAGE and RT-PCR) are necessary for certain and reliable detection of CEVd and CCaVd.