

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISION DE AGRONOMIA**



**Identificación de los Microorganismos asociados a la
Marchitez del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en
la Región Centro del Estado de Chiapas.**

Por:

ALFONSO GAMBOA MORALES

T E S I S

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Febrero del 2002**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

**DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**Identificación de los Microorganismos Asociados a la
Marchitez del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en
la Región Centro del Estado de Chiapas.**

Por:

ALFONSO GAMBOA MORALES

TESIS

**QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

APROBADO

PRESIDENTE DEL JURADO

DR. ABIEL SANCHEZ ARIZPE

M.C. Ma. ELIZABETH GALINDO C.

M.C. FAUSTINO LARA V.

M.C. REYNALDO ALONSO VELASCO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MEXICO FEBRERO DEL 2002

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

**CRESCENCIO GAMBOA MEJIA
CARLOTA MORALES ALCAZAR**

Por todos los sacrificios que hicieron para hacer de mi un hombre de bien y sobre todo por haber depositado en mi su confianza, para que concluyera con mis estudios profesionales.

A MIS HERMANOS:

MARIDALIA
VICTORIA
ELIZABETH
ESPERANZA
JOSE LUIS

Agradezco a todos ustedes el apoyo y la confianza que depositaron en mi durante todo este tiempo, por todo ello mil gracias.

A MIS PADRINOS:

RENE ESCADON
ROSA ABENDAÑO
GUADALUPE
JORGE

Gracias por haberme brindado su apoyo y sus sabios consejos.

A LA SEÑORA FAUSTINA

Por su gran amistad y apoyo incondicional que me ha brindado, además de sus consejos que me han orientado en todo momento.

A LA T.L.Q. Ma. CRISTINA

Por su valiosa amistad y por todo el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo.

A LA T.L.Q. GUILLERMINA Y SILVIA

Por su amistad y colaboraron en la realización de este trabajo.

A MIS AMIGOS:

DARINEL(†)
MARCOS
JOEL
JORGE
MIGUEL ANGEL
GUSTAVO
MARTIN

En especial a mi amigo Darinel (†), quien fue una gran persona, de quien aprendí muchas cosas y a quien prometí terminar el camino que el no pudo concluir.

A TINY

A quien agradezco por haber compartido parte de su vida conmigo y por apoyarme en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la oportunidad de existir en este mundo y por brindarme salud para seguir adelante en mi camino.

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente.

Al Dr. Abiel Sánchez Arizpe por su valiosa amistad y por la asesoría en la realización de este trabajo.

A la M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por su valiosa colaboración en esta investigación

Al M.C. Faustino Lara Victoriano por su valiosa aportación a este trabajo.

A todo el personal del departamento de parasitología quienes contribuyeron en mi formación académica.

INTRODUCCIÓN

De la gran mayoría de hortalizas que se exportan a nivel nacional, el tomate es el más importante. Su participación en la balanza agropecuaria es fundamental en la generación de divisas, ocupando el 16 % del valor total de las exportaciones agropecuarias con una producción nacional de 1,908,607 toneladas durante 1997 y se estima que de las cerca de 5.7 millones de hectáreas de riego que tiene nuestro país, el 1.5% es ocupado por tomates.

Las enfermedades son un factor limitante en la producción de tomates en muchas partes del mundo; así en la región centro del estado de Chiapas el cultivo del tomate se ve afectado por enfermedades de diferentes causas, dentro de las que podemos destacar: cenicilla , tizón temprano, tizón tardío, y el virus del enchinamiento del tomate; siendo estos dos últimos la principal limitante en la producción de tomates durante las últimas décadas. De 1998 a la fecha, el daño causado por otra enfermedad de este cultivo ha venido adquiriendo importancia económica, debido al desconocimiento del agente causal y el poco conocimiento técnico que se tiene a cerca de estos problemas fitopatológicos. Y Considerando que el diagnóstico es una herramienta esencial para llevar a cabo un buen manejo de la enfermedad, ha surgido el interés de llevar a cabo este trabajo.

OBJETIVOS

Identificar a los microorganismos asociados a la marchitez del tomate(*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la región centro del estado de Chiapas.

HIPÓTESIS

La marchitez del tomate se debe a un complejo enfermedad, donde existe la interacción hongo-bacteria.

REVISIÓN DE LITERATURA

Enfermedades vasculares del tomate

Este tipo de enfermedades es causado por dos hongos (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercici* ; *Verticillium albo-atrum* Reinke y *V. dahliae* Kleb) y dos bacterias(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) y *Pseudomonas solanacearum* (Smith),. El síndrome de estas enfermedades infecciosas se resume como: Amarillamiento y/o marchitez (más o menos reversible) del follaje y necrosis vasculares que confieren diferentes tonos de marrón al xilema (Nuez et al., 1995).

Hongos

Marchitamiento por *Fusarium*

Smith et al., (1992) mencionan que esta enfermedad se describió por primera vez en Europa en 1895 en Guernsey y la isla de Wight, Inglaterra, pero en la actualidad tiene importancia mundial, se ha señalado en al menos 32 países; y en potencia es una de las enfermedades más graves del tomate. En México se

encuentra en la región de Guanajuato, Sinaloa, Morelos, Michoacán, San Luis Potosí y otras de menor importancia (Mendoza, 1996).

Síntomas

El primer indicio de la enfermedad aparece al inicio de la floración o formación de los primeros frutos. Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en un ligero aclareamiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después de lo cual ocurre la epinastia de las hojas senescentes ocasionada por el debilitamiento de los peciolo, seguida de un achaparramiento, amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de sus hojas, tallo jóvenes, defoliación, necrosis marginal de hojas persistentes y finalmente su muerte. A menudo estos síntomas se desarrollan en un solo lado de la planta, mientras que el resto permanece sano, aunque puede manifestarse en toda la planta (Agrios, 1988 y Mendoza, 1996).

Cuando las plantas son infectadas en la etapa de plántula, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas. Las plantas adultas en el campo pueden marchitarse y morir repentinamente en caso de que la infección sea severa y el clima sea favorable para el patógeno (Agrios, 1988).

Rodríguez et al., (1997) mencionan que el amarillamiento gradualmente afecta al resto del follaje y es acompañado de un marchitamiento de la planta durante las horas más calurosas del día pudiendo más tarde recobrar su turgencia, el amarillamiento es más extensivo día con día hasta que la planta se colapsa y muere.

El tejido vascular de una planta infectada es de color café oscuro. Y esta coloración se extiende hacia arriba del tallo y especialmente notoria en una cicatriz del peciolo. La coloración café del sistema vascular es característica de la enfermedad y generalmente puede ser usada para su identificación; la medula permanece sana. El avance de la decoloración hacia la parte superior de la planta depende de la severidad de la enfermedad (Agrios, 1988 y Jones, et al., 1991).

Agrios, 1988 menciona que las plantas infectadas, en tanto sigan vivas no aparecen sobre su superficie micelio o cuerpos fructíferos del hongo, los frutos ocasionalmente infectados se pudren y desprenden sin que aparezcan manchas en ellos; las raíces son afectadas y que después de un periodo inicial de achaparramiento se pudren sus raíces laterales más pequeñas.

Fusarium es más virulento a 25-30°C de temperatura de suelo y se señala como óptimo 28°C. (Messiaen et al., 1995),

Etiología

Fusarium oxysporum (schlet) f.sp. *lycopercici*. Este hongo pertenece a la Clase Deuteromycetes, Orden Moniliales y Familia Moniliaceae (Barnett y Hunter, 1987); se desconoce su fase ascogena (estado sexual) a excepción de la forma especial que ataca al café, *F. oxysporum* f.sp. *xylaroides* (= *Giberella xylaroides*) (Alexopoulos et al., 1996).

La especie *Fusarium oxisporum* presenta tres tipos de esporas sexuales, que son: a) microconidios abundantes, no en cadena y formados de fialides simples que nacen lateralmente en la hifa o en conidioforos, de forma oval, piriformes o cilíndricos; b) macroconidios finos, alargados puntiagudos con pared delgada, anchura máxima 3-4.5 μ ; c) clamidosporas globosas, con pared gruesa, que se forma en grupo o individuales, son terminales o intercalares y se desarrollan en el micelio más viejo o en macroconidios. Los macroconidios se observan pobremente desarrollados y a menudo están ausentes, cuando más solo presentan una célula basal con 1-3 fialides apicales. La pigmentación del cultivo es de color beige, azul, violeta o blanco y su crecimiento es mayor de 2 cm, usualmente de 4-8 cm de diámetro (Booth, 1977).

Marchitamiento por *Verticillium*

Casi en todas las zonas templadas y subtropicales adyacentes *Verticillium* es un organismo común del suelo y puede atacar más de 200 especies de vegetales, incluso flores, árboles frutales, y forestales, malezas, hortalizas y cultivos extensivos. La enfermedad se conoce como marchitez y son dos las especies involucradas en ella, *Verticillium albo-atrum* y *Verticillium dahliae*. Morfológicamente estas dos especies son muy similares, excepto que *V. dahliae*, produce microesclerocios y *V. albo-atrum* no los produce (Romero, 1993).

Síntomas

Agrios (1988) menciona que la marchitez por *Verticillium* es casi idéntica a la que ocasiona *Fusarium* y en los hospedantes afectados por ambos géneros es imposible diferenciarlos, excepto mediante pruebas de laboratorio. Sin embargo, en muchos de los hospedantes y en la mayoría de las áreas, *Verticillium* induce marchitez a temperaturas más bajas y los síntomas se desarrollan más lentamente; con frecuencia aparecen solo sobre la parte inferior de la planta o sobre sus superficie o únicamente sobre algunas de sus ramas. A menudo el primer indicador de una marchitez por *Verticillium* es una forma de marchitamiento diurno. Las plantas muestran un leve a moderado marchitamiento durante las horas más calurosas del día pero se recupera durante la noche. Como avanza la enfermedad, igual se desarrolla la clorosis marginal e intervenal en los

foliolos más bajos. Esos foliolos también pueden mostrar características de lesiones en forma de V, en los cuales ocurren amarillamientos en forma de abanico, próximamente un estrechamiento de los márgenes de las hojas.

Smith et al., (1992), mencionan que la marchitez se desarrolla en general de forma acropeta y que las plantas enfermas pueden enanizarse; en el caso de infecciones graves es frecuente la desecación de las hojas seguida de una defoliación prematura.

Uno de los síntomas de la marchitez por *Verticillium* puede observarse en los tallos y raíces que en corte transversal, muestran parte de los tejidos del xilema(en forma de anillo) teñido de un color café oscuro (Romero, 1993).

Los brotes iniciales de marchitez por *Verticillium* en un campo son típicamente moderados y locales. En años posteriores los ataques son más severos y se distribuyen más ampliamente. Dos especies de *Verticillium*, *V. albo-atrum* y *V. dahliae*, son la causa de la marchitez por *Verticillium*; las temperaturas promedio de 20-25°C favorecen el ataque de *V. albo-atrum*, mientras que la infección de *V. dahliae* es favorecida por temperaturas un poco mayores de 25-28°C (Agrios, 1988).

Etiología

Tanto *Verticillium albo-atrum* Reinke como *V. dahlie* Kleb, pertenecen a la Clase Deuteromycetes, Orden Moniliales y Familia Moniliaceae (Barnett y Hunter, 1987).

V. albo-atrum aparece obscuro después de 2-3 semanas de incubación en medio de cultivo PDA, a causa del oscurecimiento del resto del micelio, agregación de pigmentadas células hifales. Los conidioforos sostienen varios verticilios de dos a cuatro fialides. Los conidios son hialinos, de una célula y de forma elipsoidal, midiendo 3.5-10.5 X 2.5 μm ; *V. dahlie* es similar a *V. albo-atrum*. En realidad, por muchos años *V. dahlie* cultivados fueron clasificados como formadores de cadenas de microesclerocios de a *V. albo-atrum* (Jones et al., 1991).

En cultivos de Agar *V. dahlie* se tornaba negro debido a la formación de numerosos esclerocios (80-120 X 15-50 μm). En conidioforos hialinos se desarrollan verticilios de tres a cuatro fialides. Los conidios son hialinos, de una sola célula y de forma elipsoidal, sus medidas son 2.5 X 1.4-3.2 μm . La formación de microesclerocios en el tejido de la planta es tan bien como en los cultivos es la llave de importancia taxonómica (Jones, et al., 1991).

Bacterias

Cáncer bacteriano

Jones et al.,(1991), mencionan que el cáncer bacteriano fue observado por primera vez en Michigan, E.U.A. en 1990 por E.F. Smith. Es una enfermedad seria que se presenta en todo el mundo. La ocurrencia de esta enfermedad es esporádica, pero puede ser devastadora. En todos los tipos de cultivo del tomate están propensos a serias pérdidas; algunas veces, la enfermedad es especialmente severa tanto en tomates de transplante o de siembra directa que han sido cortados o podados.

Síntomas

Los primeros síntomas observables son el manchado o marchitamiento de los folíolos de las partes externas e inferiores de la planta. El manchado de las hojas se produce cuando el clima es húmedo y aparecen inicialmente en forma de manchas ampulosas blancas y se ponen cafés con forme maduran y pueden coalescer(Rodríguez et al., 1997).

Rodríguez et al., (1997) y Agrios (1988), mencionan que los primeros síntomas son una necrosis marginal de los folíolos de las hojas más bajas y como consecuencia se curvan hacia arriba y hacia adentro, y más tarde se empardecen

y marchitan, pero no se desprenden de la planta. Con frecuencia la enfermedad solo afecta a los foliolos de un lado de la hoja o de un costado de la planta.

En principio un solo brote puede aparecer marchito mientras que el resto de la planta permanece normal, aunque más tarde el mal se extiende al tallo y gran parte del follaje es destruido. Las plantas enfermas pueden morir prematuramente, pero normalmente sobreviven hasta el final de la cosecha. Al mismo tiempo, sobre los tallos, vástagos y pedicelos de las hojas aparecen varias bandas de colores claros, a menudo al nivel de punto de unión de los peciolo y tallos. Más tarde, pueden formarse grietas en dichas bandas, las cuales forman cánceres. Cuando el clima es húmedo, por los cánceres exudan masas mucilaginosas de bacterias hasta la superficie del tallo (Rodríguez et al., 1997).

A menudo las hojas más bajas se marchitan primero, mientras que las hojas de la parte de arriba permanecen turgentes hasta la fase terminal de la enfermedad. Algunas veces, si la infección comienza en una herida cuando el brote terminal es podado, entonces la enfermedad se desarrolla y se mueve rápidamente hacia abajo, matando la planta. Sobre el tallo pueden desarrollarse raíces adventicias y áreas nodales que ocasionalmente tienen una zona blanca muy notoria. Internamente el tejido vascular de los tallo primero exhibe rayas amarilluzcas o café, las cuales más tarde se tornan café-rojizas, tales decoloraciones son más notorias en los nudos. Eventualmente la medula llega a decolorarse y se puede de aspecto harinoso y se forman grandes cavidades de

color oscuro. Los síntomas pueden confundirse con los del marchitamiento por *Pseudomonas*, pero los tallos infectados por el cáncer bacteriano, al hacer un corte y aplicar una fuerza suave, puede producir un ceno amarillo (Jones et al., 1991).

Los síntomas de la enfermedad en los frutos aparecen en forma de pequeñas manchas blancas, aguanosas y superficiales cuya parte central sobre sale más tarde, la cual adquiere un color canela y se vuelve rugosa. El aspecto fina de las manchas tiene la forma de ojo de pájaro, con un diámetro de 3-6 mm.; las cuales son características propias de la enfermedad, aunque no siempre ocurre estos síntomas en el fruto. También puede ocurrir una coloración amarilla en la cicatriz del cáliz(Agrios, 1988).

Etiología

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith); es una bacteria Gram positiva, no forma esporas, es aeróbica. Los reportes de movilidad y encapsulación son variados, pero en general la bacteria es considerada negativa para estas características. Las células pueden ser pleomórficas, pequeñas, en forma de cocos o de bastón, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Las colonias en agar nutritivo son característicamente amarillas y alcanza un diámetro de 2-3 mm en cinco días, lisas de márgenes enteros y de consistencia butirosa. La apariencia de la colonia en medios selectivos varía, dependiendo del medio (Jones et al., 1991).

Marchitamiento bacteriano

Esta enfermedad está ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales y de clima caliente de todo el mundo(Rodríguez et al., 1997).

Síntomas

El marchitamiento bacteriano aparece inicialmente como una flacidez en uno o más de las hojas más jóvenes. Bajo condiciones ambientales favorables este síntoma es seguido de un completo y rápido marchitamiento. Los estados avanzados de la enfermedad pueden ocurrir después de 2-3 días después de que aparecen los primeros síntomas. Pueden aparecer raíces adventicias en los tallos de las plantas infectadas (Jones et al., 1991).

Éstas son más pronunciadas cuando la enfermedad se desarrolla lentamente bajo condiciones menos favorables de las óptimas. Baja temperatura, cepa con baja virulencia, y hospederos resistentes, son factores que promueven la formación de raíces adventicias. También puede ocurrir una epinastia de las hojas cuando la enfermedad se desarrolla lentamente. En etapas tempranas de la enfermedad, el sistema vascular de las plantas muestra una coloración amarilla o cafesusca en secciones transversales o longitudinales. Y a medida que la enfermedad progresa esta coloración se torna a café oscuro. Cuando la planta

está completamente marchita, la médula y la corteza también se tornan de color café(Jones et al., 1991).

Una masiva invasión de la corteza puede resultar en lesiones de apariencia aguanosas en la superficie externa del tallo. Si un tallo infectado es cortado transversalmente, escurren pequeñas gotas de exudados viscosos de color blanco sucio o amarillento de los bultos vasculares severamente afectados. El marchitamiento bacteriano puede ser fácilmente distinguido de las enfermedades vasculares causadas por hongos, suspendiendo un trozo limpio de tallo infectado en un vaso de agua. Un flujo sucio blanco lechoso de células bacterianas fluye de los elementos del xilema de la planta infectada en 3-5 minutos. Si el tallo está severamente infectado, el que se torna completamente lechosa en 10-15 minutos. Los síntomas en las partes bajas aparecen como varios grados de pudrición de raíces, dependiendo del grado de desarrollo de la enfermedad. Inicialmente, una o pocas raíces pueden mostrar una pudrición café. Algunas veces, a medida que la enfermedad progresa la planta llega a permanecer marchita. El sistema entero de la raíz puede mostrar una pudrición café(Jones et al., 1991).

Etiología

Pseudomonas solanacearum (Smith) es una bacteria gram negativa en forma de vara, con medidas de 0.5-0.7 X 1.5-2.0 μm , es móvil, con uno a cuatro

flagelos, es aeróbica, catalaza y oxidasa positiva y forma nitritos a partir de nitratos. Esta bacteria es negativa a la prueba de producción de levana, hidrólisis de almidón, producción de indol, e hidrólisis de esculina. Ésta causa una ligera hidrólisis de gelatina (Jones et al., 1991).

Fusarium solani

En las regiones templadas, por lo general, no se ha detectado la presencia de *F. solani*, ascomiceto capaz de provocar podredumbres del cuello en las solanáceas hortícolas. Por el contrario, en condiciones tropicales, sobre los cuellos podridos se advierte la presencia de *F. solani* que produce, a su vez, su forma conídica y su forma perfecta (peritecas rojas denominadas *Hypomyces solani* o *Nectria haematococa*) (Rodríguez et al., 1997).

Etiología

Fusarium solani f.sp. lycopersici. Este hongo pertenece a la Clase Deuteromycetes, Orden Moniliales y Familia Moniliaceae (Barnett y Hunter, 1987); presenta macroconidios gruesos, no puntiagudos, pared gruesa, anchura máxima 4.5-5.5 μ . Masa de esporas, crema amarilla; pigmento azul, azul-verde o violeta (Romero, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la muestra

La muestra, que consistía de cuatro plantas, fue colectada en un de los lotes de producción de tomates variedad Rio grande en el poblado Las Rosas, en la región centro del estado de Chiapas. Cada planta fue envuelta en papel periódico levemente humedecido y colocadas por separado en bolsas de plástico. Las cuales fueron enviadas por estafeta al laboratorio de diagnóstico de hongos y bacterias del departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, donde se examinaron los síntomas presentes y en base a estos se determinó que se trataba de un problema de tipo vascular, donde los posibles patógenos involucrados eran dos hongos y dos bacterias (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* y *Verticillium spp*) y dos bacterias (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) y *Pseudomonas solanacearum* (Smith); ya que el síndrome de estas enfermedades infecciosas se resume como: Amarillamiento y/o marchitez (más o menos reversible) del follaje y necrosis vasculares que confieren diferentes tonos de marrón al xilema (Nuez et al., 1995), mismos que se hacían notar en las muestras obtenidas.

Así de esta manera se procedió con el diagnóstico enfocado en los patógenos mencionados anteriormente.

Aislamiento del patógeno

Hongos

Para el aislamiento de estos microorganismos se utilizó la técnica de siembra de tejido enfermo en medio de cultivo PDA, para lo cual se cortaron pequeños trozos de tejido enfermo de aproximadamente 5 mm², los cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante un tiempo de 2 minutos, y después se lavaron tres veces en agua destilada estéril, se secaron sobre una sanita estéril y después se colocaron cuatro trozos de tejido enfermo en cada caja con medio de cultivo PDA y se incubaron durante dos días a 28°C y luego se colocaron durante ocho días bajo luz blanca (Sánchez, 2002).

Bacterias

Para el caso de bacterias se utilizó el método de siembra de tejido enfermo por diluciones, para lo cual primeramente se lavó el material vegetativo con agua de la llave para quitar los excesos de tierra, posteriormente del total de la muestra se seleccionó el órgano de la planta que presentaba los síntomas, para lo cual se seleccionó el tallo, el cual presentaba lesiones en los haces vasculares (bandas longitudinales de color café); haciendo uso de una navaja previamente flameada se retiró la epidermis del tejido con la finalidad de evitar el arrastre de

microorganismos contaminantes, flameando nuevamente la navaja se rebanaron finos trozos del tejido los cuales se maceraron y se colocaron con unas pinzas previamente flameadas en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y sobre una gradilla se dejó reposar durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente para así obtener al término de este tiempo una solución con exponente 10^{-1} (solución inicial). Transcurrido este tiempo se llevó el material a la cámara de transferencia, la cuál había sido previamente desinfectada con alcohol etílico al 99%, y ahí se realizaron las diluciones de la siguiente manera: haciendo uso de una pipeta esterilizada y a punta de mechero se colocó 1 ml de la solución inicial (10^{-1}) en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, obteniendo así la solución 10^{-2} la cuál se homogeneizó en el agitador electromagnético para después tomar de esta solución 1 ml para depositarlo en un segundo tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, obteniendo así la solución 10^{-3} , y de esta manera se prosiguió hasta obtener la solución 10^{-5} ; cave mencionar que todo esto se hizo a punta de mechero (Sánchez, 2002).

Para el vaciado en los medios de cultivo, se utilizaron las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} , que en teoría son las concentraciones en las cuales las colonias bacterianas crecerían de manera más separadas, lo cuál facilitaría y permitiría hacer una mejor selección las colonias de interés. El vaciado se hizo de la siguiente manera: con una pipeta estéril y a punta de mechero se vació 0.1 ml de la dilución 10^{-3} en cada una de las cajas con medio de cultivo, para lo cuál se utilizaron 4 cajas de medio de cultivo CNS(apéndice), 2 cajas del medio D₂ de la serie KDO (apéndice) y 2 cajas de medio KB (apéndice); las cuales estaban etiquetadas con la

concentración utilizada y la parte de la planta de donde se había obtenido el tejido. Posteriormente con una barilla de cristal previamente flameada y a punta de mechero se esparció la muestra haciendo girar la caja petri y repitiendo una y otra vez el movimiento de la barilla de cristal con la finalidad de no concentrar el crecimiento en un solo punto de la superficie del medio de cultivo. De esta misma manera se procedió con la dilución 10^{-5} y una vez concluida esta labor, las cajas de medio de cultivo sembradas se sellaron con Kleen pack y se colocaron en la incubadora a 28° (Sánchez, 2002).

Las colonias desarrolladas en los diferentes medios se seleccionaron en cuanto a su forma, y característica de desarrollo en cada uno de los medios: y se llevaron a la cámara de transferencia la cual había sido previamente desinfectada con alcohol al 99% y haciendo uso de un asa bacteriológica previamente flameada, bajo un estereoscopio, se tomo una porción de cada colonia seleccionada, y de esta manera se transfirieron por punción y por estría cruzada a una nueva caja de medio de cultivo del mismo tipo de donde había sido extraída, con la finalidad de obtener cultivos puros. Las cajas se sellaron con Kleen pack y se colocaron de manera invertida en la incubadora a 28°C(Sánchez, 2002).

Tinción de Gram

Una vez desarrollada la bacteria el primer paso fue hacer una Tinción de Gram para saber si ésta era Gram (+) o Gram (-) para esto sobre un porta

objetos previamente etiquetado con número de cepa se colocó una gota de agua destilada estéril y a punta de mechero se tomo una porción de la masa bacteriana y se hizo un frotis, el cual se fijo a la flama y se dejó secar a temperatura ambiente; posteriormente bajo la llave de agua y sobre un puente de cristal se colocaron los porta objetos, a los cuales sobre el frotis se les adicionó, la solución de cristal violeta dejándola actuar por un minuto, luego se decanto el colorante y se lavo con agua de la llave a chorro lento para después aplicar la solución de lugol, la cual se dejó actuar también por un minuto; nuevamente se decantó el colorante y el frotis se lavó con una mezcla de alcohol-acetona hasta observar que no se desprendiera más colorante, lavándose en seguida con agua de la llave para impedir que el alcohol-acetona siguiera actuando; inmediatamente, se le adicionó la solución de safranina y se dejó actuar durante un minuto transcurrido este tiempo se decanto el colorante, se lavo el frotis con agua de la llave y se dejo secar a temperatura ambiente, para después adicionarle una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio compuesto en un aumento de 100 X (Rodríguez,1994).

Prueba de RYU

Para corroborar los resultados de la tinción de Gram se realizó esta prueba, la cuál consistió en hacer un frotis de una suspensión bacteriana sobre un porta objetos con una gota de agua destilada; el cual se froto con una asa bacteriológica

previamente flameada y levantarla para observar si había o no la formación de un hilo a partir de la masa bacteriana (Sánchez, 2002).

Tinción de flagelos

Esta prueba consistió en colocar en uno de los extremos del porta objetos una gota de agua destilada estéril y con un asa bacteriológica previamente flameada, a punta de mechero se tomó crecimiento bacteriano desarrollado en el medio y se depositó en la gota de agua frotando suavemente para que se formara una suspensión; se inclinó el porta objetos hacia uno de sus extremos de tal manera que la gota se deslizara a lo largo de este, se dejó secar al aire libre enseguida se colocaron los porta objetos sobre un puente de cristal en donde se adicionó la solución de mordente de flagelos dejándolo actuar durante cinco minutos, transcurrido este tiempo se decantó la solución y se enjuagó el frotis a chorro lento con agua de la llave, evitando que el agua cayera de golpe sobre la preparación; en seguida se le adicionó el cristal violeta y se dejó actuar por dos minutos, se decantó la solución y se enjuagó con agua de la llave, teniendo siempre cuidado de que el agua no cayera de golpe sobre la preparación, se dejó secar a temperatura ambiente y adicionándole una gota de aceite de inmersión se observó al microscopio compuesto en un aumento de 100 X (Rodríguez, 1994).

Producción de citocromo oxidasa

En una tira de papel filtro se colocó una gota de la solución acuosa al 1% de N,N, dimetil para fenil diamina, inmediatamente después y con ayuda de un asa de platino previamente flameada, se depositó sobre el reactivo un poco de crecimiento bacteriano, esperando alrededor de 20 segundos para ver si se observaba un cambio de coloración del reactivo (Rodríguez, 1994).

Prueba de la catalasa

Sobre un porta objetos se colocó una gota de agua oxigenada y sobre de ésta se colocó una porción de masa bacteriana y se frotó para observar la presencia de efervescencia en el caso de ser positiva o la ausencia de ésta cuando la reacción era negativa (Sánchez, 2002).

Metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa

Bajo la cámara de transferencia previamente esterilizada, con un asa bacteriológica se colocó una porción de masa bacteriana por picadura en dos tubos de medio Hugh y Leifson (apéndice), procurando que la bacteria llegara hasta el fondo del medio y al sacar el asa se hizo un movimiento ligero de rotación para ir depositando el excedente bacteriano a lo largo del medio. A uno de los

tubos se le adicionó dos mililitros de aceite mineral esterilizado para provocar la condición anaerobia. A cada tubo se le colocó su respectivo testigo. Los tubos se incubaron a 28° C por un espacio de 24-36 horas; Se considera fermentación positiva cuando el medio con aceite mineral presenta un cambio de coloración de azul- verde a amarillo y se considera oxidación cuando el tubo sin aceite mineral cambió de color en la misma forma (Kelman, A. Y Dickey, R. S. 1980, citados por Rodríguez, 1994).

Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Para esta prueba se preparo primero el medio YGM (Apéndice) omitiendo la glucosa y el agar pero agregando 12 ml de azul de bromotimol al 0.2 % (el cual se preparo disolviendo 0.2 gramos de azul de bromotimol en 5 ml de hidróxido de sodio (NaHo) al 1 normal y aforando a 100 ml con agua destilada). Ajustando el pH del medio a 7.0, se esterilizo por autoclave. Se prepararon los carbohidratos disolviendo 10 g en 100 ml y se esterilizaron por filtración. Se agregaron los carbohidratos cuando el medio estaba frío y se dispersaron asépticamente en tubos de 5 ml; luego se inoculo el medio con la bacteria y se incubo a 28°C. La prueba se considera positiva cuando el medio de cultivo cambia de un color verde a amarillo (Saettler et al., 1989).

Utilización de ácidos orgánicos

Para esta prueba se preparo el medio YGM (Apéndice) sin glucosa y agar pero con azul de bromotimol como anteriormente se mencionó. Se agregó 0.2 g de ácido orgánico (sal sódica) para 100 ml del medio base y se ajustó el pH a 6.8, se esterilizó, luego se dispersó en los tubos de ensayo para después inocular el medio con la bacteria e incubarlo a 28°C. La prueba se considera positiva cuando el medio de cultivo cambia a un color azul brillante (Saettler et al., 1989).

Hidrólisis de esculina y caseína

Para esta prueba se preparo el medio SC (Apéndice) suplementado con 1% de caseína o 0.1 % de esculina y 0.05 % de citrato férrico, según se trate. El cual se vació en cajas petri, donde se sembró por punción cultivo bacteriano de 24 hrs. La prueba se considera positiva cuando alrededor de la bacteria se desarrolla un halo de color claro en el caso de la caseína y un halo de color café en el caso de la esculina (Schaad, 1988).

Reacción de hipersensibilidad

Para llevar a cabo esta prueba, primeramente se preparó una suspensión bacteriana con 10^7 UFC/ml y por medio de una jeringa estéril se infiltró a los

espacios intercelulares de una hoja de tabaco(*Nicotiana tabacum*), a través de la nervadura central, posteriormente se cubrió la planta con una bolsa de plástico durante 24 hrs, la prueba se considera positiva si dentro de las 24 hrs posteriores a la inoculación la zona infiltrada presenta, pérdida de turgencia o necrosis (Roríguez,1994).

Crecimiento en presencia de cloruro de tetrazolio

Cultivos bacterianos de 24-48 horas fueron sembrados en un medio con cloruro de tetrazolio, la siembra se realizó por punción con la ayuda de un asa bacteriológica, luego se incubo a 28°C (Schaad,1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hongos

De los aislamientos hechos en medio de cultivo PDA, se obtuvieron varios crecimientos fungosos, los cuales mediante una selección basada en el color y desarrollo del micelio, se obtuvieron tres tipos de colonia, una de aspecto rojizo , otra de color crema y una tercera de color café oscuro, los cuales eran predominantes en el aislamiento; éstas se transfirieron a una caja con el mismo medio de cultivo (PDA) y se incubaron dos días a una temperatura de 28° C y luego de 8 días bajo luz blanca, se realizaron montajes permanentes y haciendo uso de las claves taxonómicas de Barnett, & Hunter, (1987) se identificaron a los géneros *Alternaria* y *Fusarium*; considerando que el género *Alternaria* muchas veces se manifiesta como contaminante, además de que el tejido aislado no presentaba síntomas producidos por este género, se desecho este aislamiento, quedando así únicamente el aislamiento que contenía al género *Fusarium*. Para determinar la especie de *Fusarium*, se utilizaron las claves propuestas por Both, (1977); determinando así que se trataba de dos especies de *Fusarium*, siendo estas *F. oxysporum*, que presentó macroconidios y microconidios y una fialide corta en forma de botella; y *F. solani* que presentó macroconidios y microconidios similares a los de *F. oxysporum* difiriendo solo en el tamaño de la fialide, la cual era larga y en forma cilíndrica.

Bacterias

De los aislamientos hechos en los tres diferentes medios de cultivo, se obtuvieron crecimientos bacterianos únicamente en dos de ellos, siendo estos el medio CNS y el medio D₂ de la serie KDO. Para el caso del medio CNS se seleccionaron tres colonias desarrolladas a partir de la dilución 10⁻³, dilución en la cual las colonias crecieron más espaciadas una de otra, dichas colonias presentaban un crecimiento lento, consistencia mucóide, colonias convexas y de color amarillo a naranja, características propias del género *Clavibacter*. Y para el caso del medio D₂, de la serie KDO se seleccionaron tres colonias, una de ellas desarrollada a partir de la dilución 10⁻³ y dos colonias más de la dilución 10⁻⁵, cuyo crecimiento fue más rápido en comparación con las colonias desarrolladas en el medio CNS. Del medio KB, no se seleccionó ninguna colonia, ya que en este medio se esperaba crecimientos bacterianos con pigmentos fluorescentes, propios del género *Pseudomonas* que ataca al tomate, los cuales no se manifestaron.

Las colonias bacterianas aisladas en medio D₂ crecieron a las 24 horas, después de haber hecho la siembra en el medio de cultivo, mientras que en el medio CNS, el desarrollo fue más lento, obteniendo el crecimiento bacteriano en un lapso de tiempo comprendido entre 36 a 48 horas después de haber realizado el aislamiento.

Una vez purificadas los cultivos de las diferentes colonias seleccionadas, se procedió a la caracterización de éstas, mediante pruebas bioquímicas (según Schaad 1988).

Tabla 1. Características diferenciales de bacterias fitopatógenas corineformes (Schaad, 1988)

Patógeno	Gram	Movilidad	Pigmento NBY	Crecimiento		Producción de ácidos		
				CNS	TTC	Ribosa	Sorbitol	Inulin
<i>Clavibacter michiganense</i> Subsp. <i>michiganense</i>	+	-	Amarillo	+	+	-	-	-

Utilización		Hidrólisis	
Acetato	Formato	Caseína	Esculina
-	-	-	+

Tabla 2. Pruebas bioquímica para los aislamientos obtenidos de tomate

Aislamiento	Gram	Ryu	Movilidad	Oxidasa	Catalaza	O / f		Crecimiento		Producción de ácidos		
						+	-	CNS	TTC	Ribosa	Sorbitol	Inulin
1	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-

Utilización		Hidrólisis	
Acetato	Formato	Caseína	Esculina
-	-	-	+

Los resultados de estas pruebas concuerdan con los de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* caracterizada por Schaad (1988).

Al realizar la tinción de Gram, esta fue positiva, ya que la coloración del frotis fue morada, además se observaron células de forma cocoide y agregados en forma de coma, lo cual coincide con lo mencionado por Schaad, (1988). Para corroborar este resultado se realizó la prueba de Ryu, la cual fue negativa; siendo este el resultado esperado, ya que el resultado de esta prueba debe ser opuesto al de la tinción de Gram, La prueba de oxidasa se consideró negativa, debido a que el papel filtro no tomó ninguna coloración transcurrido los treinta segundos requeridos para tal efecto. La prueba de la catalasa fue positiva al producirse efervescencia al entrar en contacto la masa bacteriana con el agua oxigenada; en seguida se hizo la prueba de movilidad la cual dio resultado negativo al no encontrar ningún flagelo a la célula bacteriana. El crecimiento en medio CNS fue positivo, al mostrarse un desarrollo de la bacteria en dicho medio, al igual que en el medio TTC. El resultado en la prueba de oxidación fue positiva, debido a que se manifestó un cambio en la coloración del medio que no contenía aceite mineral, siendo así fermentación negativa. La producción de ácidos a partir de carbohidratos(Ribosa, sorbitol e inulin), se consideró negativa al no experimentar ningún cambio de coloración en el medio de cultivo(verde a amarillo); de igual manera la utilización de ácidos orgánicos(sal sódica) se consideró negativa al no presentar cambio en la coloración del medio (verde claro a azul brillante). La hidrólisis de caseína se consideró negativa al no formar un halo transparente alrededor de la colonia bacteriana. Pero el resultado si fue positivo para la hidrólisis de esculina, al cambiar de un color claro a oscuro alrededor de la colonia bacteriana; así también fue positiva la reacción de hipersensibilidad en

tabaco, al perder turgencia y después necrosarse el área infiltrada con la solución bacteriana.

Los resultados obtenidos en todas las pruebas anteriormente descritas, concuerdan con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* caracterizada por Schaad, 1988, acerca del cáncer bacteriano del tomate.

CONCLUSIONES

1.- Los microorganismos asociados a la marchitez del tomate en la región centro del estado de Chiapas son: *Fusarium oxysporum*, *fusarium solani*, y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

2.- Aunque se aisló a *fusarium solani*, no hay reportes de que este hongo produzca marchitamientos en tomate; por lo cual podemos considerarlo como de menor importancia en la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, N. G. 1988. Plant Patology. 3^a Edition. Academic Press, Inc. U.S.A.
412 p.

Alexopoulos C. J., C. Mims W. and M. Blackwell. 1996. Introductory micology.
Fourt Edition. Edit. Jhon Wiley & Sons, Inc. United States of América.
869 p.

Barnett, H. L. & Hunter, B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi.
Fourth Edition. Macmillan Publishing. United States of América.

Booth, C. 1977. *Fusarium*, Laboratory guide to the identification of the major
Species. Common wealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 58
p. Citado por Higuera, S. V.M. 2001.

Jones, J. B. ; Stall, R. E. & Zitter, T. A. 1991. Compendium of tomato diseases.
The American Phytopathological Society. E.U. p 1.

Messiaen C. M., Blancard C. Rouxel F. Y Lafon R. 1995. Enfermedades de las
hortalizas. Ediciones-Mundiprensa. Madrid, España. Pp 162-170.

Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. U A C H. México.
21 p.

Nuez, V. F. ; Rodriguez, R. ; Tello, J. 1995. El Cultivo del Tomate. Edicines
Mundi-Prensa. Madrid, España. 43 p.

Romero C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo.
México. 311-312 p.

Rodríguez, R. R. ; Tabares, R. J. M. ; Medina, J. J. A. 1997. Cultivo Moderno del
Tomate 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 167 p.

Rodríguez, M. M. De L. 1994. Manual de Identificación de Bacterias.
Fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
46,95,96,101,102,110-112,114 p.

Sánchez. M.C. 2002. Manual de Microbiología. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah.
México.

Smith, I. M. ; Dunez, J. ; Lelliott, R. A. 1992. Manual de Enfermedades de las
Plantas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 341 p.

Schaad N. W. 1988. Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2 nd Edition. The American Phytopathological Society. APS press. Unites States of America. 109 p.

Saettler A. W., Schaad N. W. and Roth D. A. 1989. Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material. The American Phytopathological society. APS press. Unites States of America. 101 p.

RESUMEN

La marchitez del tomate, es una enfermedad muy importante por las pérdidas que ocasiona en todos los tipos de cultivo de esta hortaliza, tanto en la región centro de Chiapas como en todas las áreas donde se cultivan tomates, es por tal razón que el presente trabajo tiene como objetivo identificar a los microorganismos asociados a la marchitez del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), según la hipótesis mediante la cual se plantea que la marchitez del tomate se debe a un complejo enfermedad, donde existe la interacción hongo-bacteria; para lo cual se llevaron a cabo aislamientos de hongos en medio de cultivo PDA y bacterias en medios selectivos: CNS, D₂ de la serie KDO y KB, las cuales se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas. Y como resultado se identificó a los hongos *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Con lo cual concluimos que los organismos asociados a la marchitez del tomate en la región centro del estado de Chiapas son: *Fusarium solani*, *F. oxysporum* y la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Siendo estos dos últimos los de mayor importancia, ya que hasta la fecha no hay reportes de que *Fusarium solani* produzca marchitez en tomates.

APÉNDICE

FÓRMULAS DE MEDIOS DE CULTIVO

Y

PREPARACIÓN DE RACTIVOS

I. MEDIOS PARA AISLAMIENTO

1.1. MEDIO B DE KING (KB)

Proteosa peptona # 3	20.0 g
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	1.5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	1.5 g
Agar	15.0 g
Glicerol	15.0 g
Agua	1000.0 ml

- Se puede emplear peptona

1.2. PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)

Papa en trozos	200.0 g
Dextrosa	18.0 g
Agar	18.0 g
Agua	1000.0 ml

II. MEDIOS SELECTIVOS

2.1. MEDIO D₂

Glucosa	10.0 g
Hidrolizado de caseína	4.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
NH ₄ Cl	1.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.3 g
LiCl	5.0 g
Tris (Hidroximetil) amonio metano	1.2 g
Agar	15.0 g
Agua	1000.0 ml

Disuelva los ingredientes en el agua, ajuste el pH a 7-8 con HCl y esterilice.

Cuando el medio tenga una temperatura de 50°C adicione:

Sulfato de polimixina	40 mg (300 unidades)
Azida de sodio	2 mg

Este medio se utiliza para el aislamiento de *Corynebacterium* y se debe preparar al momento de emplearse para evitar que la azida y polimixina se descompongan con el tiempo.

2.2. MEDIO CNS

Caldo de nutrientes	8.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Fosfato de potasio monobasico	2.0 g
Fosfato de potasio dibasico	0.5 g
Cloruro de litio	5.0 g
Agar	6.5 g
Agua doblemente destilada	480.0 ml

Esterilice juntos(después del autoclave el pH es 6.9), enfríe alrededor de 50°C y entonces agregue los siguientes reactivos:

Ciclohexamida	0.020 g ó 2.0 ml
Ácido nalixidico	0.0125 g ó 1.25 ml
Sulfato polimixidico B	0.016 ó 1.6 ml
Daconil 2787-F	0.00048 g ó 0.03 ml
Glucosa	2.5 g ó 25.0 ml
Sulfato de magnesio, anhidro	0.062 g ó 0.05 ml

2.3. MEDIO CON CLORURO DE TETRAZOLIO (TTC)

Peptona	10.0 g
Hidrolizado d caseína	1.0 g
Glucosa	5.0 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Ajustar el pH a 7.0, esterilizar en autoclave y cuando el medio tenga una temperatura aproximada de 50-55°C, adicionar 5 ml de una solución al 1% de cloruro de tetrazolio, esterilizado por filtración.

III. MEDIOS PARA CARACTERIZACIÓN

3.1. MEDIO DE HUGH Y LEIFSON

Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Agar	3.0 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Glucosa	10.0 g
Agua	1000.0 ml

El pH se ajusta a 7.1 antes de adicionar el agar. La glucosa se esteriliza por filtro milipore o en autoclave.

3.2. MEDIO YGM

Extracto de levadura	2.0 g
Glucosa	2.5 g
Solución A	2.5 g
Solución B	2.5 g
Solución C	2.5 g
Agar	18.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Solución A:

$K_2 HPO_4$	10.0 g
$KH_2 PO_4$	10.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Solución B:

$MgSO_4 \cdot 7H_2 O$	4.0 g
$MnSO_4 \cdot H_2 O$	0.6 g
NaCl	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Solución C:

FeSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
Agua destilada	100.0 ml

3.3. MEDIO SC

Peptona de soya	8.0 g
Cloruro de hemin	15.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
Agar miel de maíz	17.0 g
Glucosa	1.0 g
Cysteina (base libre)	10.0 g
Albumina suero de bovino fracción V	10.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Los ingredientes se agregados y disueltos en agua desionizada en el orden mencionado. Los componentes del medio, excepto la glucosa, cysteina y albumina suero de bovino con el resto de las soluciones son esterilizados por filtración y agregados a el resto del medio en 50 C. ElmpH puede ser 6.6-6.7, antes de ajustarse.

IV. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

4.1. REACTIVOS PARA TINCIÓN DE GRAM

4.1.1. SOLUCIÓN DE CRISTAL VIOLETA

El cristal violeta actúa como colorante primario y se prepara de la siguiente forma:

Cristal violeta	0.5 g
Fenol	2.5 g
Etanol al 96%	20.0 g
Glicerina	80.0 g
Agua destilada	100.0 ml

El cristal violeta puede ser sustituido por violeta de genciana, violeta de metilo o azul de metileno.

4.1.2. SOLUCIÓN DE LUGOL

Esta solución debe tener pH alcalino, por que a pH ácido, las bacterias gram positivas aparecen como gram negativas y se prepara de la siguiente manera:

Yodo	1.0 g
KI	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

4.1.3. SOLUCIÓN DE SAFRANINA

Es el colorante secundario o de contraste y está formado por lo siguiente:

Safranina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Esta solución o colorante no es indispensable en esta tinción, sino que únicamente se emplea para distinguir mejor si una bacteria es gram negativa o positiva y al igual que el cristal violeta se puede sustituir por una solución de fucsina 1:20 o pardo de Bismark al 0.1%.

4.2. REACTIVOS PARA TINCIÓN DE FLAGELOS

MORDENTE

Ácido tánico	20.0 g
CrO ₃ sol. Acuosa al 2.5%	15.0 ml
Agua caliente	80.0 ml

El ácido tánico se disuelve en 80 ml de agua caliente, y se agrega la solución de CrO_3 , se mezclan y se guardan en el refrigerador durante 4 días, en un recipiente obscuro.

Para emplear el mordente se debe de filtrar previamente.

4.3. PRUEBA DE OXIDASA

Tetrametil para fenilendiamina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelve el reactivo y se guarda en frascos oscuros