

# Impacto de la fertilización con bioestimulantes microbianos en la morfología, color y acumulación de carotenoides en frutos de chile habanero (*Capsicum chinense*) cultivados en macrotúnel

Impact of fertilization with microbial biostimulants on the morphology, color, and carotenoid accumulation in habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruits grown in macrotunnel

Humberto Estrella-Maldonado<sup>1\*</sup>✉, José Azareel Hernández-García<sup>2</sup>, Ricardo Santillán-Mendoza<sup>1</sup>, Felipe Roberto Flores-de la Rosa<sup>1</sup>, Cristian Matilde-Hernández<sup>1</sup>, Arianna Chan-León<sup>2</sup>, Jacel Adame-García<sup>2\*</sup>✉

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), CIR Golfo Centro, Campo Experimental Ixtacuaco, Km 4.5, Carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Tlapacoyan, Veracruz, México. CP. 93600

<sup>2</sup> Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Úrsulo Galván. Carretera Cd. Cardel-Chachalacas Km 4.5, Úrsulo Galván, Veracruz, México. CP. 91667.

## RESUMEN

Una estrategia para reducir el uso de fertilizantes químicos y mejorar la absorción de nutrientes por parte del cultivo es mediante el uso de bioestimulantes durante la fertilización de las plantas. Aunque es bien conocido que los bioestimulantes microbianos se han utilizado en la agricultura para optimizar el crecimiento vegetal en frutas y verduras, se desconoce cómo estos bioestimulantes mejoran la calidad del fruto de chile habanero. Asimismo, aunque los niveles de expresión de genes pertenecientes a la biosíntesis de carotenoides están directamente relacionados con la acumulación de carotenoides totales en *Capsicum*, su regulación no está completamente comprendida en frutos de chile habanero. El objetivo de este estudio fue evaluar el peso, diámetro polar y diámetro ecuatorial, medir el color, analizar los niveles de expresión del gen ZDS y cuantificar el contenido de carotenoides totales en frutos maduros de chile habanero de la variedad Velociraptor fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos durante su crecimiento en macrotúnel. En particular, la bacteria *Priestia megaterium* (cepa JAFV4) mostró un efecto significativo con frutos más rojos (altos valores  $a^*$ ) con mayor nivel de expresión del gen ZDS, así como mayor contenido de carotenoides totales en comparación a frutos del tratamiento testigo.

**Palabras clave:** agricultura protegida, carotenoides, expresión génica, fertilización, *Priestia megaterium*.

## ABSTRACT

One strategy to reduce the use of chemical fertilizers and improve nutrient uptake by crops is through the use of biostimulants during crop fertilization. Although microbial biostimulants are well known to be used in agriculture to optimize plant growth of fruits and vegetables, it is unknown how these biostimulants improve the quality of habanero pepper fruit. Furthermore, although the expression levels of genes belonging to carotenoid biosynthesis are directly correlated with the accumulation of total carotenoids in *Capsicum*, their regulation in habanero pepper fruits is not

fully understood. The objective of this study was to evaluate the weight, polar and equatorial diameter, measure color, analyze the expression levels of ZDS gene and quantify the total carotenoid content in ripe fruits, produced from habanero pepper plants of the Velociraptor variety, treated with different microbial biostimulants during their growth in macrotunnel. In particular, the bacterium *Priestia megaterium* (strain JAFV4) showed a significant effect with redder fruits (high  $a^*$  values) with a higher ZDS gene expression level, as well as a higher content of total carotenoids compared to fruits from the control treatment.

**Keywords:** Protected agriculture, carotenoids, gene expression, fertilization, *Priestia megaterium*.

## INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense*) es un producto agrícola con gran demanda en el mercado nacional e internacional debido a su agradable olor, picor y sobre todo por su alto contenido de pigmentos carotenogénicos. Los cambios de color durante la maduración del fruto son debido a una acumulación en la composición de carotenoides, y a la diversidad genética entre diferentes variedades de chiles (Ro *et al.*, 2024). En el contexto agrícola, la producción de cultivos con elevado contenido en carotenoides ha adquirido gran relevancia, no solo por sus beneficios nutricionales, sino también por su aplicabilidad en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Shanaida *et al.*, 2025). Entre los cultivos con alto valor funcional, el chile habanero destaca por su abundante acumulación de estos compuestos, los cuales confieren su coloración característica y propiedades antioxidantes de interés comercial (Rodríguez-Urbe *et al.*, 2019). La biosíntesis de carotenoides en plantas está altamente regulada a nivel transcripcional, la expresión de los genes involucrados en esta vía carotenogénica puede verse modulada por diversos factores ambientales y fisiológicos (Cunningham y Gantt, 1998). Dentro de esta ruta metabólica, el gen  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) desempeña un papel determinante al catalizar la conversión de  $\zeta$ -caroteno en

\*Autor para correspondencia: Humberto Estrella-Maldonado; Jacel Adame-García  
Correo-e: estrella.humberto@inifap.gob.mx; jacel.ag@ugalvan.tecnm.mx

Recibido: 5 de noviembre de 2025

Aceptado: 25 de enero de 2026

Publicado: 19 de febrero de 2026

licopeno, el cual es un precursor clave para producir otros carotenoides importantes, incluyendo el  $\beta$ -caroteno y la capsantina, compuestos esenciales en la fisiología del chile habanero (Othman *et al.*, 2014).

Sin embargo, la producción de chile habanero se realiza principalmente con fertilización química, actividad que puede ser ineficiente debido a que gran parte del fertilizante aplicado se libera al medio ambiente, ocasionando un déficit de disponibilidad para las plantas (Benbi, 2013). En consecuencia, han surgido métodos alternativos de fertilización orgánica con bioestimulantes microbianos, los cuales son formulaciones a base de microorganismos benéficos, capaces de mejorar las propiedades nutritivas de frutas o vegetales al aumentar la acumulación de carotenoides y flavonoides (Baslam *et al.*, 2011), así como el crecimiento vegetal mediante la solubilización de nutrientes (du-Jardin, 2015). Su empleo ha ganado atención en la agricultura sostenible debido a su bajo impacto ambiental y su potencial para incrementar la calidad nutricional de los cultivos sin recurrir a insumos químicos convencionales (Pérez-Montañón *et al.*, 2014). Hoy en día, el uso de estos bioestimulantes microbianos han tenido efectos positivos en la calidad de frutos en condiciones de macrotúnel (Murillo *et al.*, 2021). El sistema de macrotúnel ofrece un entorno adecuado para analizar los efectos de los bioestimulantes microbianos en la morfología del fruto de chile habanero, aspecto clave para evaluar su impacto en la calidad del fruto. El aumento en la biomasa del fruto y una mayor acumulación de carotenoides podría indicar la eficacia de los bioestimulantes en el desarrollo del fruto, lo cual contribuye a mejorar su calidad comercial y valor nutricional. El objetivo del presente estudio fue evaluar las características morfológicas (peso del fruto, diámetro polar y ecuatorial), intensidad de color (método CIEL\*a\*b\*), niveles de expresión relativa del gen ZDS ( $\zeta$ -caroteno desaturasa), así como el contenido de carotenoides totales presentes en frutos maduros producidos de plantas de chile habanero del cultivar (cv) Velociraptor fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos durante su crecimiento en macrotúnel.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el ciclo productivo 2024-2025 en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Campo Experimental Ixtacuaco (CEIXTA) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), con coordenadas 20°02'35.7"N 97°05'52.5"W, donde se realizaron todas las evaluaciones morfológicas y moleculares de los tratamientos.

### Establecimiento del macrotúnel

El macrotúnel fue construido según lo reportado por Adame-García *et al.* (2022), con modificaciones. Las dimensiones del macrotúnel fue de 3 m de ancho por 30 m de largo (90 m<sup>2</sup>) dividido en la mitad a 15 m en forma de "L", forrado con malla antiáfidos. Dentro del macrotúnel se fabricaron dos camas de producción con medidas de 90 cm de ancho y 30 cm de altura,

entre ambas camas se contempló una distancia entre sí de 40 cm de ancho para el andador. Posteriormente, se colocó acolchado blanco-negro, con un marco de plantación de una planta cada 25 cm a tresbolillo, con un total de 60 plantas por cama y dividido a la mitad a 15 m de largo el macrotúnel en forma de "L". Se utilizó un sistema de riego de cuatro salidas de agua y 30 m de cintilla calibre 6000 para cada cama, conectadas a la línea principal con cuatro válvulas de paso para controlar el riego del cultivo.

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile habanero cultivar Velociraptor de la casa comercial Lark Seed International®. Las semillas germinaron en charolas de plástico utilizando sustrato a base de musgo de turba y fueron regadas cada segundo día hasta lograr su germinación al cabo de 30 a 45 días.

### Manejo agronómico del cultivo en macrotúnel

Las plántulas germinadas con una altura promedio de 8-10 cm fueron trasplantadas directamente en cama de producción bajo condiciones de macrotúnel ( $35 \pm 4$  °C, humedad relativa del  $70 \pm 5$  %, periodo de luz natural). Bajo estas condiciones, todas las plantas fueron regadas con 50 mL de agua destilada cada 5 días durante los primeros 20 días. Posteriormente, se efectuó una fertilización química al suelo, dirigida al cuello de la planta, asegurando el completo mojado del sustrato mediante aplicación por vía "drench" compuesta por 1 g de DAP + 1 g de urea disueltos en 50 mL de agua (DAP + urea). Asimismo, se aplicó fertilización foliar a base de micronutrientes (2 L ha<sup>-1</sup> en 200 L de agua; Bayfolan®). Al inicio de la floración se siguió aplicando cada 15 días DAP + urea y Bayfolan®, sin embargo, también se adicionó Boro/Calcio/Zinc (2 L ha<sup>-1</sup> en 200 L de agua; CaBo Zinc®) hasta concluir el ciclo productivo, con la finalidad de aumentar la floración y ayudar en la formación correcta de los frutos (Jacel-Adame *et al.*, 2022).

### Fertilización con bioestimulantes microbianos en macrotúnel

Los bioestimulantes microbianos fueron generados y donados por el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Úrsulo Galván. Todos los bioestimulantes microbianos se ajustaron a una concentración de 0.4 a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de espectrometría. La medición y calibración de los bioestimulantes mediante el método OD<sub>600</sub> nos permitió cuantificar la concentración de microorganismos en una suspensión líquida (Krumm, 2019). La primera aplicación con bioestimulantes microbianos se realizó el día 11 de diciembre del 2024 (6 días después de la fertilización química). La fertilización con los diferentes bioestimulantes microbianos se aplicaron cada 15 días al suelo vía drench con una dosis de aplicación de 20 % (v/v). De igual forma, todos los tratamientos mantuvieron las mismas condiciones de fertilización y manejo del cultivo en condiciones de macrotúnel.

## Diseño experimental

El diseño experimental consistió en 7 tratamientos (Tabla 1): 1 tratamiento control al cual no se aplicó bioestimulantes microbianos a las plantas (TT), 5 tratamientos con diferentes bacterias [plantas fertilizadas con *Bacillus subtilis* (T1), plantas fertilizadas con *Stenotrophomonas sp.* (T2), plantas fertilizadas con *Bacillus wiedmannii* (T3), plantas fertilizadas con *Priestia megaterium* código JAFV4 (T4) y plantas fertilizadas con *Priestia megaterium* código AERM5 (T5)], 1 tratamiento que consistió en aplicar una mezcla de todas las bacterias (T6). Se realizó un diseño experimental en bloques completos al azar con tres repeticiones técnicas distribuidos en dos camas de producción bajo condiciones de macrotúnel. Cada cama de producción estaba formada de tres bloques que correspondieron a cada tratamiento (7 plantas por bloque). En cada bloque experimental los bioestimulantes se aplicaron cada 15 días al suelo, dirigidos al cuello de la planta vía drench. En total se realizaron 5 aplicaciones con bioestimulantes microbianos (del 11 de diciembre de 2024 al 1 de marzo de 2025). El día 10 de marzo de 2025 los frutos fueron cosechados y se utilizaron 9 frutos al azar por cada tratamiento y para cada repetición (total de 27 frutos por cada tratamiento). Se colectaron frutos de chile habanero sanos, completos y en madurez de consumo, posteriormente, fueron lavados con detergente comercial y se dejaron secar a temperatura ambiente para realizar los posteriores análisis.

## Caracterización morfológica de los frutos

Las variables morfológicas de los frutos fueron registradas durante tres cortes, para tal efecto, se colectaron nueve frutos al azar por repetición con la finalidad de evaluar el peso, diámetro polar y ecuatorial de los frutos. Los pesos en gramos fueron cuantificados con la ayuda de una balanza analítica (OHAUS Adventurer®). El diámetro polar (extremo apical hasta la base del fruto) y ecuatorial (porción media del fruto) de los frutos fueron medidos utilizando un calibrador Vernier (INSIZE 1205-1502E) con una precisión de 0.02 mm.

## Medición del índice de color

El color del pericarpio se midió utilizando tres puntos de cada cara plana del fruto (cerca del pedúnculo, en la parte central y cerca del ápice). Se utilizó un colorímetro portátil (Linshang LS172) para mediar los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , según el espacio de color tridimensional ( $L^*a^*b^*$ ) establecido por la

**Tabla 1.** Tratamientos con diferentes bioestimulantes microbianos durante el crecimiento y maduración de plantas de chiles habaneros cv. Velociraptor.

**Table 1.** Treatments with different microbial biostimulants during growth and ripening of habanero pepper plants cv. Velociraptor.

| Tratamiento | Bacteria (Bioestimulantes)  | Código del Bioestimulante |
|-------------|-----------------------------|---------------------------|
| TT          | Testigo                     | -                         |
| T1          | <i>Bacillus subtilis</i>    | FDMC1                     |
| T2          | <i>Stenotrophomonas sp.</i> | JAG2                      |
| T3          | <i>Bacillus wiedmannii</i>  | JAG3                      |
| T4          | <i>Priestia megaterium</i>  | JAFV4                     |
| T5          | <i>Priestia megaterium</i>  | AERM5                     |
| T6          | Conjunto de todas           | -                         |

Comisión Internacional de Iluminación (CIE). Los valores CIE  $L^*$  representa el brillo en una escala de unidades de 0 (negro puro) a +100 (blanco puro); los valores CIE  $a^*$  representa de -60 (verde puro) a +60 (rojo puro); y los valores CIE  $b^*$  representa de -60 (azul puro) a +60 (amarillo puro). Los valores  $a^*$  y  $b^*$  se utilizaron para calcular el ángulo de matiz ( $H^\circ$ ) y el croma ( $C^*$ ).

## Aislamiento de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se aisló el ARN total a partir del pericarpio de los frutos maduros de chile habanero provenientes de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos bajo condiciones de macrotúnel. El aislamiento del ARN total se llevó a cabo mediante el protocolo CTAB al 2% establecido por Estrella-Maldonado *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Las muestras fueron tratadas con ADNasa I libre de ARNasa para eliminar la contaminación de ADN genómico (Thermo Fisher Scientific, Ambion, Waltham, MA, EE. UU.). La concentración y pureza del ARN fue cuantificada mediante espectrofotómetro NanoDrop One® (Thermo Scientific NanoDrop Technologies) y la calidad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % durante 30 min a 80 V. Para evitar la degradación del ARN aislado, las muestras fueron resguardadas a -80° C. El ADNc fue sintetizado utilizando 200 ng del ARN total y se utilizó la enzima transcriptasa inversa M-MLV según el protocolo recomendado por el fabricante (Promega).

## Análisis de expresión del gen ZDS mediante RT-qPCR

Para analizar los niveles de expresión génica se diseñaron oligonucleótidos con el software Primer3 desarrollado por el Instituto Whitehead de Investigación Biomédica (Tabla 2). La RT-qPCR se realizó en un termociclador con el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y se utilizó el reactivo PowerTrack™ SYBR Green para la detección de señales. La especificidad y la precisión de las amplificaciones por RT-qPCR para todas las muestras se confirmaron mediante análisis de curvas de disociación. Las reacciones se llevaron a cabo adicionando 1  $\mu$ L de ADNc (200 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 1  $\mu$ L de cada cebador específico (5 mM), 5  $\mu$ L de PowerTrack™ SYBR Green y 2  $\mu$ L de agua ultra pura. El gen  $\beta$ -tubulina se utilizó como gen de referencia para normalizar todos los datos (No. EF495259.1). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo el siguiente protocolo: 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 59 °C durante 30 s (según la hibridación específica de cada gen) y 72 °C durante 1 min. Los niveles de expresión relativa (REL) del gen ZDS (No. NM\_001324568.1) se calcularon utilizando el método comparativo 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> (Livak y Schmittgen, 2001). El análisis de expresión se realizó utilizando tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para cada réplica biológica. Los datos REL del gen ZDS evaluado en los diferentes tratamientos se sometió a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) ( $p < 0,05$ ) mediante una prueba de Tukey utilizando el software Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., EE. UU.).

**Tabla 2.** Información de oligonucleótidos seleccionados para realizar análisis mediante RT-qPCR.  
**Table 2.** Information on selected oligonucleotides for RT-qPCR analysis.

| Gen                   | Código | ID             | Especie                | PRIMERS                                              | pb  | °C | Referencia                |
|-----------------------|--------|----------------|------------------------|------------------------------------------------------|-----|----|---------------------------|
| Beta tubulina         | β-Tub  | EF495259.1     | <i>Capsicum anuumm</i> | F: GAGGGTGAGTGAGCAGTTC<br>R: CTCATCGTCATCTGCTGTC     | 167 | 61 | Wan <i>et al.</i> (2011)  |
| ζ-caroteno desaturasa | ZDS    | NM_001324568.1 | <i>Capsicum anuumm</i> | F: TCGGATGAGTTGAGTCTTGTC<br>R: ACTGAAGCGTGCCAGAATAGA | 198 | 61 | Wang <i>et al.</i> (2024) |

Cuantificación de carotenoides totales

Se utilizó 1 g de pericarpio el cual fue macerado con ayuda nitrógeno líquido. Al tejido macerado se le adicionó 3 g de celite y 25 mL de acetona. La suspensión fue transferida a un embudo de separación de 500 mL el cual contenía 40 mL de éter de petróleo. Para eliminar la acetona, se añadió agua ultra pura lentamente para evitar la formación de emulsión. Se distinguieron dos fases: (1) una fase orgánica compuesta por éter de petróleo que contenía los carotenoides, y (2) una fase acuosa constituida por agua y acetona. La fase orgánica se transfirió a un matraz aforado para su posterior cuantificación, mientras que la fase acuosa fue descartada. El contenido de carotenoides de los extractos se determinó mediante espectrofotómetro NanoDrop One® (Thermo Scientific NanoDrop Technologies). La lectura de la muestra se llevó a cabo utilizando de referencia una longitud de onda de 450 nm y se utilizó éter de petróleo como blanco. El cálculo del contenido total de carotenoides fue determinado según lo reportado por Wellburn (1994) con modificaciones.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron bajo un diseño completamente aleatorio. Para todas las variables, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar las diferencias significativas entre las medias ( $p < 0,05$ ) utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., EE. UU.) (<http://www.statgraphics.com>). Todas las figuras se graficaron utilizando el programa SigmaPlot versión 11.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal han sido ampliamente utilizados como bioestimulantes como una estrategia efectiva para aumentar el rendimiento y la calidad frutos (Katsenios *et al.*, 2021). En la Figura 1 se aprecian frutos de chile habanero obtenidos de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos durante su

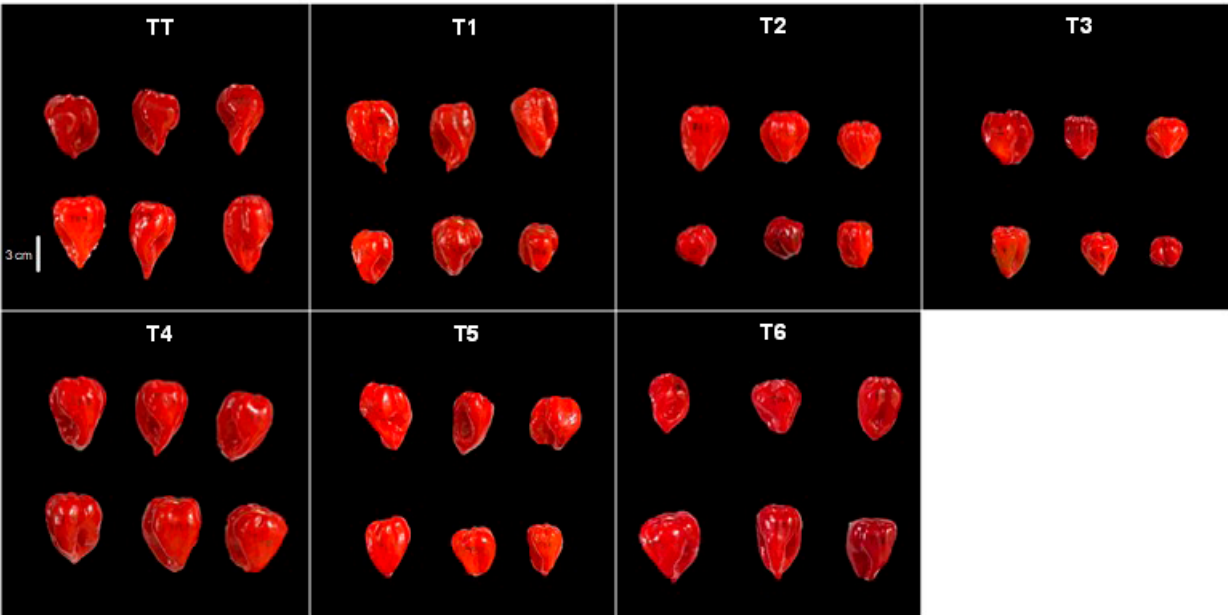


**Figura 1.** Frutos de chiles habanero obtenidos de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos durante su crecimiento y maduración bajo condiciones de macrotúnel. TT: sin fertilización de bioestimulantes, T1: plantas fertilizadas con *Bacillus subtilis*, T2: plantas fertilizadas con *Stenotrophomonas* sp., T3: plantas fertilizadas con *Bacillus wiedmannii*, T4: plantas fertilizadas con *Priestia megaterium* código JAFV4, T5: plantas fertilizadas con *Priestia megaterium* código AERM5, T6: plantas fertilizadas utilizando un conjunto de todas las bacterias.  
**Figure 1.** Habanero pepper fruits obtained from plants fertilized with different microbial biostimulants, during their growth and ripening under macrotunnel conditions. TT: without biostimulant fertilization, T1: plants fertilized with *Bacillus subtilis*, T2: plants fertilized with *Stenotrophomonas* sp., T3: plants fertilized with *Bacillus wiedmannii*, T4: plants fertilized with *Priestia megaterium* code JAFV4, T5: plants fertilized with *Priestia megaterium* code AERM5, T6: plants fertilized using a combination of all the bacteria.

crecimiento y maduración bajo condiciones de macrotúnel. Los resultados indicaron que los frutos obtenidos de plantas sin fertilización de bioestimulantes (TT) mostraron pesos que oscilaron entre 17 y 20 g, seguido de frutos con plantas fertilizadas con *Bacillus subtilis* (T1) y *Stenotrophomonas sp.* (T2) con pesos de entre 14 a 19 g. Sin embargo, los frutos de los tratamientos T3 (*Bacillus wiedmannii*), T5 (*Priestia megaterium*) y T6 (conjunto de todas), mostraron menor peso con valores que oscilaron entre 10 a 15 g. Interesantemente, los frutos obtenidos de plantas fertilizadas con *Priestia megaterium* (T4) mostraron mayor peso de entre 18 a 23 g (Figura 2a). Respecto a la longitud, el diámetro polar de los frutos tratados con *Stenotrophomonas sp.* (T2) y *Bacillus wiedmannii* (T3), fueron los más pequeños al presentar valores de entre 2 a 5 cm. Los frutos de los demás tratamientos (TT, T1, T4-T6) fueron más grandes con valores de diámetro polar que oscilaron entre 3.5 a 5.8 cm (Figura 2b). Respecto al diámetro ecuatorial (con excepción de los frutos del tratamiento T6), todos los frutos mostraron valores que oscilaron entre 3 a 4 cm (Figura 2c). Resultados similares se reportó en plantas de tomate, indicando que la cepa con *Priestia megaterium* incrementó el peso seco de las plantas de tomate, mientras que las cepas con *Bacillus subtilis* y *Priestia megaterium* incrementaron el peso medio de fruto por planta en 30.70 % y 26.78 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento control (Katsenios *et al.*, 2021).

Hoy en día, debido a la amplia gama de colores y la acumulación de carotenoides en frutos maduros de *Capsicum*, los estudios recientes se han centrado en cuantificar índices de color en muchas variedades de chiles habaneros y establecer una relación directa con su aporte nutricional en la alimentación. En nuestro estudio, la mayoría de los frutos presentaron valores de luminosidad (valor L\*) entre 34 hasta 36, sin embargo, frutos del tratamiento T3 (*Bacillus wiedmannii*) y T5 (*P. megaterium*) su luminosidad fue mayor (39.6 y 40.1, respectivamente). Además, estos mismos frutos (T3 y T5) presentaron altos valores de croma (C\*) (35.18 y 37, respectivamente) y altos valores de su ángulo de tono (Hue), (36.1 y 30.7, respectivamente). Respecto a valores b\* (color amarillo), los frutos del tratamiento T3 y T5 fueron más amarillos (21.3 y 18.79, respectivamente), seguido del tratamiento T2 (*Stenotrophomonas sp.*). Respecto a valores a\* (color rojo), los frutos más rojos fueron los fertilizados con *Priestia megaterium* (T5 y T4) con valores cercanos a 33.89 y 29.95 respectivamente (Tabla 3). Similarmente, en un estudio realizado en cuatro especies de *Capsicum* (*Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum annuum*) determinaron que los frutos maduros mostraban una luminosidad mínima de 29, un color rojo de entre 8 hasta 59, un color amarillo de entre 4 hasta 70, así como un croma y tonalidad arriba de 15 (Bhattarai *et al.*, 2024). Por lo anterior, hipotetizamos que la bacteria *Priestia megaterium* (T4 y T5) aumentó la disponibilidad del potasio en las plantas fertilizadas, lo que a su vez favoreció tanto el desarrollo como la intensidad del color rojo en los frutos. Este hallazgo adquiere relevancia frente a un estudio reciente de Wu *et al.* (2023),

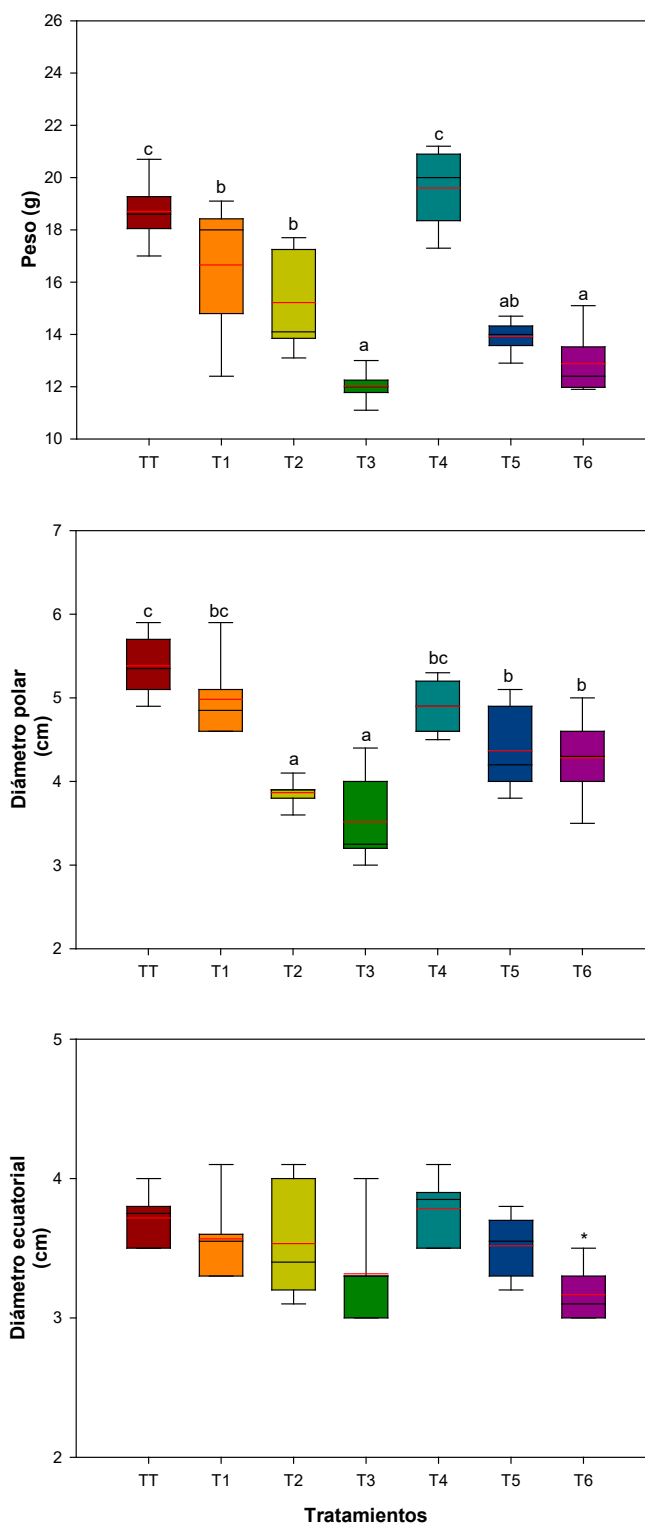


**Figura 2.** Peso en gramos (a), diámetro polar (b) y diámetro ecuatorial (c) en frutos de chile habanero provenientes de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos durante su crecimiento y maduración bajo condiciones de macrotúnel. Letras diferentes y símbolo \* indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** Weight (g) (a), polar diameter (b), and equatorial diameter (c) of habanero pepper fruits obtained from plants fertilized with different biostimulants, during growth and ripening under biotunnel conditions. Different letters and symbol \* indicates significant differences ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 3.** Componentes de color del pericarpio de frutos de chile habanero obtenidos de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos durante su crecimiento y maduración bajo condiciones de macrotúnel.**Table 3.** Color components of the pericarp of habanero pepper fruits obtained from plants fertilized with different microbial biostimulants, during their growth and ripening under macrotunnel conditions.

| Tratamientos | L*             | a*              | b*              | C              | Hue             |
|--------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| TT           | 33.93 ± 2.02 a | 28.51 ± 1.02 b  | 14.56 ± 1.05 a  | 32.23 ± 0.98 a | 27.36 ± 0.86 a  |
| T1           | 35.95 ± 1.64 a | 27.47 ± 1.85 ab | 14.65 ± 1.27 a  | 30.93 ± 1.31 a | 28.65 ± 1.73 ab |
| T2           | 36.37 ± 1.17 a | 25.77 ± 1.57 a  | 16.92 ± 1.03 b  | 30.50 ± 1.71 a | 33.83 ± 1.12 c  |
| T3           | 39.61 ± 2.16 b | 27.3 ± 1.2 ab   | 21.30 ± 1.22 d  | 35.18 ± 1.76 b | 36.18 ± 1.11 d  |
| T4           | 35.07 ± 0.93 a | 29.95 ± 1.69 c  | 15.49 ± 1.02 ab | 31.56 ± 2.07 a | 27.59 ± 0.48 a  |
| T5           | 40.19 ± 1.41 b | 33.88 ± 1.85 d  | 18.79 ± 0.84 c  | 37.00 ± 2.54 b | 30.71 ± 1.27 b  |
| T6           | 34.65 ± 1.3 a  | 28.74 ± 2.39 b  | 14.76 ± 1.17 a  | 32.49 ± 1.06 a | 27.66 ± 0.87 a  |

El valor de cada componente es la representación de la media y su desviación estándar (±) de nueve frutos.

The value of each component is the representation of the mean and its standard deviation (±) of nine fruits.

quienes aislaron la cepa *Priestia megaterium* (denominada NK851), capaz de solubilizar potasio a partir de minerales como el feldespato potásico. De este modo, la bacteria logró liberar cantidades significativas de potasio, entre 157 y 222 mg/L, al cabo de 3 y 5 días, respectivamente.

Para comprender el mecanismo regulador del metabolismo de los carotenoides en frutos de chile habanero, se analizó la expresión del gen ZDS en el pericarpio de chiles habaneros maduros producidos a partir de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos bajo condiciones de macrotúnel. Los frutos rojos de todos los tratamientos mostraron expresión del gen ZDS, lo cual era de esperarse debido a que el gen ZDS participa en la vía de biosíntesis de carotenoides, específicamente en la conversión de  $\zeta$ -caroteno a  $\beta$ -caroteno y licopeno, los cuales son precursores de varios pigmentos carotenoides, incluyendo el color naranja y rojo. Como se muestra en la Figura 3, los frutos de chiles habaneros fertilizados con *Priestia megaterium* (T4) mostraron los valores más altos de expresión del gen ZDS (3.2), el cual fue significativamente más alto en comparación a los demás tratamientos. Asimismo, con excepción de los frutos tratados con *Stenotrophomonas sp.* (T2), los demás frutos (T1, T3, T4, T5, T6) mostraron mayores niveles de expresión del gen ZDS en comparación al tratamiento testigo (TT) (Figura 3). En un estudio similar, Kato *et al.* (2004) reportaron altos niveles de expresión del gen ZDS en frutos maduros de chile habanero de coloración naranja, esta alta expresión condujo a la acumulación de xantofilas, debido a que ZDS forma parte del conjunto de genes que producen  $\beta$ - $\beta$  xantofilas. Asimismo, Bouvier *et al.* (1994), reportó que, en frutos maduros de chile habanero de color rojo, el nivel de expresión del gen ZDS disminuyó, sugiriendo que está baja expresión podría deberse a los elevados niveles de expresión del gen CCS, que conllevan a una elevada acumulación de capsantina, principal carotenoide en los chiles rojos.

Los niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides están directamente relacionados con los altos niveles de acumulación total de carotenoides en las diferentes especies de *Capsicum* (Ha *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2022). En este sentido, se ha identificado que los carotenoides presentes en frutos de chiles rojos consisten principalmente

de capsantina, capsorrubina,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, anteraxantina y violaxantina (Mohd *et al.*, 2019), sin embargo, la capsantina es el carotenoide más abundante en los frutos rojos de chiles habaneros y representa en *C. chinense* el 45% de los carotenoides totales (Ko *et al.*, 2022). Los resultados de la cuantificación de carotenoides totales en frutos maduros de chile habanero se ilustran en la Figura 4. El contenido de carotenoides totales más alto fue cuantificado en frutos de chile habanero obtenidos de plantas fertilizadas con *Priestia megaterium* (T4 y T5) con valores cercanos a 1207.62 y 1078.2  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco (PF) respectivamente, seguido de frutos obtenidos de plantas fertilizadas con *Bacillus wiedmannii* (T3) y frutos del tratamiento T6 (conjunto de todos los bioestimulantes microbianos), ambos tratamientos mostraron valores cercanos a 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de PF. Los chiles obtenidos de plantas fertilizadas con *Bacillus subtilis* (T1) y frutos de plantas no fertilizadas (TT), mostraron valores de 900  $\mu\text{g g}^{-1}$  de PF. Respecto a los frutos de plantas fertilizadas con *Stenotrophomonas sp.* (T2) mostraron los valores más bajos del contenido de carotenoides totales (741.52  $\mu\text{g g}^{-1}$  de PF) (Figura 4). En frutos maduros rojos de *C. annuum* el contenido total de carotenoides es de 3211 mg/100 g de peso seco (PS) (Deli *et al.*, 1992). Sin embargo, la composición de carotenoides se ve alterada conforme el fruto madura, por ejemplo, en chiles rojos, los principales carotenoides fueron capsantina (35%),  $\beta$ -caroteno (11,6%) y violaxantina (10%) (Curl, 1962). De igual forma, el contenido total de carotenoides totales en frutos maduros de chile paprika fue de 994.71 mg 100  $\text{g}^{-1}$  de PS (Deli *et al.*, 2001). Asimismo, frutos de *Capsicum chinense* de la variedad roja Aji Dulce, el contenido de carotenoides totales fue de  $1.10 \pm 0.24 \text{ mg g}^{-1}$  de PS y en la variedad amarilla Jamaican Yellow el contenido fue de  $1.48 \pm 0.70 \text{ mg g}^{-1}$  de PS (Guzman *et al.*, 2010). En comparación a nuestros resultados, cuantificamos valores entre 900 a 1200  $\mu\text{g g}^{-1}$  de PF de carotenoides totales en frutos maduros rojos de la variedad Velociraptor de *Capsicum chinense*, lo anterior, indica una concentración relativamente alta de carotenoides en este tipo de fruto. Este alto contenido de carotenoides en los frutos maduros rojos del cultivar Velociraptor de *Capsicum chinense* sugiere que estos frutos podrían contener compuestos antioxidantes como catequina, ácido clorogénico-

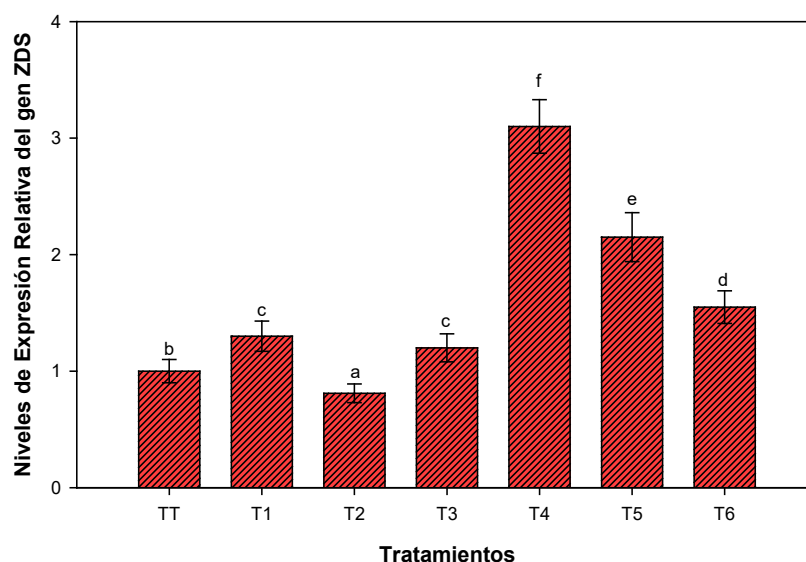


**Figura 3.** Niveles de expresión relativa del gen ZDS mediante RT-qPCR en frutos de chile habanero obtenidos de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes microbianos bajo condiciones de macrotúnel.

**Figure 3.** Relative expression levels of the ZDS gene by RT-qPCR in habanero pepper fruits obtained from plants fertilized with different microbial biostimulants under macrotunnel conditions.

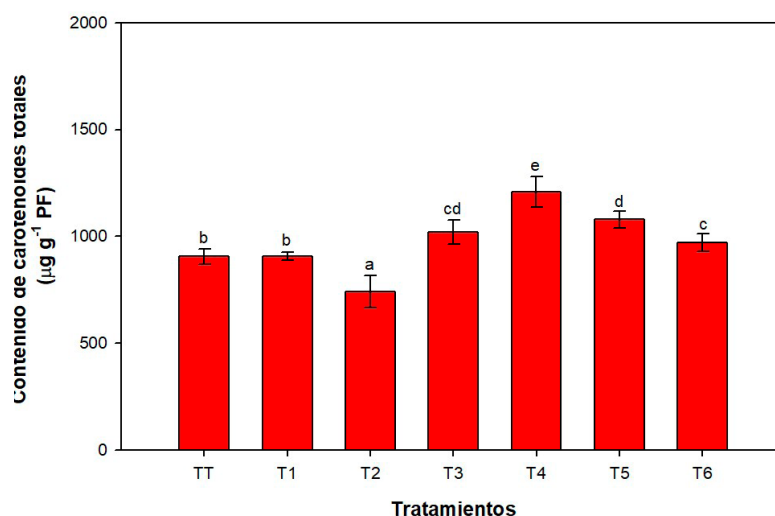


**Figura 4.** Contenido de carotenoides totales expresado en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco en frutos de chile habanero obtenidos de plantas fertilizadas con diferentes bioestimulantes bajo condiciones de macrotúnel.

**Figure 4.** Total carotenoids content expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  of fresh weight in habanero pepper fruits obtained from plants fertilized with different biostimulants under macrotunnel conditions.

co y ruteína, además de que su consumo podría repercutir benéficamente en la salud humana y en la prevención de enfermedades (Oney-Montalvo *et al.*, 2020).

En la agricultura, la bacteria endófito *Priestia megaterium* (anteriormente conocida como *Bacillus megaterium*), produce ácidos orgánicos y enzimas extracelulares que liberan fósforo al suelo y que no están disponibles para las plantas,

mejorando así la absorción de este nutriente por parte de las plantas (Sharma *et al.*, 2013). Asimismo, *Priestia megaterium* puede contribuir a otras actividades que promueven el crecimiento de las plantas, como la fijación de nitrógeno, la solubilización del zinc y la producción de fitohormonas de crecimiento vegetal (Dinesh *et al.*, 2018; Saxena *et al.*, 2020). En plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica rapa chinensis*

tratadas con *Priestia megaterium* produjo cantidades significativas de la fitohormona auxina, mejorando en gran medida las partes aéreas y las raíces de las plantas durante su crecimiento y desarrollo. Además, estas plantas fertilizadas con *Priestia megaterium* mostraron una mayor tolerancia bajo tratamientos de estrés salino y estrés hídrico, sus valores de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fuga de electrolitos, prolina y malondialdehído, fueron menores en comparación a plantas no tratadas, así, los datos mostraron que la inoculación de las plantas *Priestia megaterium* disminuyó el daño por estrés oxidativo causado por el estrés salino e hídrico (Hwang *et al.*, 2022). Por lo anterior, los resultados del presente estudio corroboran que la fertilización de las plantas con la bacteria *Priestia megaterium* (JAFV4) mejoró el peso y tamaño de los frutos, además de aumentar la expresión del gen ZDS y acumular un mayor contenido de carotenoides totales en comparación con los demás tratamientos. Esto sugiere que esta bacteria podría ser un componente beneficioso para el cultivo de chile habanero, promoviendo un mayor desarrollo de los frutos.

## CONCLUSIONES

En resumen, la fertilización con *Priestia megaterium* (JAFV4) promovió la producción de frutos de chile habanero con una mayor intensidad de color rojo, evidenciada por un incremento significativo en los valores del parámetro a\*. De igual forma, los frutos fertilizados con *Priestia megaterium* (T4) presentaron altos niveles de expresión del gen ZDS (3.2), valor que fue significativamente superior en comparación con los demás tratamientos. Asimismo, el contenido de carotenoides totales fue significativamente mayor en frutos provenientes de plantas fertilizadas con *Bacillus wiedmannii* (JAG3), *P. megaterium* (JAFV4 y AERM5), así como en aquellas que recibieron la mezcla de bioestimulantes (T6).

## AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México (TecNM) por el financiamiento del proyecto “Expresión de genes involucrados en la síntesis de carotenoides durante la aplicación de bioestimulantes microbianos en chile habanero en macrotúnel”, clave 19569.24-P.

## REFERENCIAS

- Adame-García J., Murillo-Cuevas, F.D., Cabrera-Mireles, H., Villegas-Narváez, J., Rivera-Meza, A.E. y Vásquez-Hernández, A. 2022. Efecto de bioestimulantes microbianos en frutos de chile morrón y jitomate producidos en macrotúnel. *Biotecnia*. 25(1): 81–87.
- Baslam, M., Garmendia, I. y Goicoechea, N. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 5504–5515.
- Benbi, D.K. 2013. Greenhouse gas emissions from agricultural soils: Sources and mitigation potential. *Journal of Crop Improvement*. 27(6): 752–72.
- Bhattarai, A., Nimmakayala, P. y Davenport, B. 2024. Genetic tapestry of *Capsicum* fruit colors: a comparative analysis of four cultivated species. *Theoretical and Applied Genetics*. 137: 130.
- Bouvier, F., Hugueney, P., d’Harlingue, A., Kuntz, M. y Camara, B. 1994. Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5, 6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant Journal*. 6: 45–54.
- Cunningham, F.X. y Gantt, E. 1998. Genes for the biosynthesis of carotenoids in plants. *Plant Physiology*. 49(1): 557.
- Curl, A.L. 1962. The carotenoids of red bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 10: 504–509.
- Deli, J., Matus, Z. y Szabolcs, J. 1992. Carotenoid composition in the fruits of black paprika (*Capsicum annuum* variety longum nigrum) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 2072–2076.
- Deli, J., Molnár, P., Matus, Z. y Tóth, G. 2001. Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. lycopersiforme rubrum) during ripening; biosynthesis of carotenoids in red paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 1517–1523.
- Dinesh, R., Srinivasan, V., Hamza, S., Sarathambal, C., Gowda, S.A., Ganeshamurthy, A., Gupta, S., Nair, V.A., Subila, K. y Lijina, A. 2018. Isolation and characterization of potential Zn solubilizing bacteria from soil and its effects on soil Zn release rates, soil available Zn and plant Zn content. *Geoderma*. 321: 173–186.
- du-Jardin, P. 2015. Plants bioestimulants: definition, concept, main categories, and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196: 3–14.
- Estrella-Maldonado, H., Fuentes, O.G., Chan, L.A.C., Rodríguez, Z.L.C., Talavera, M.C., Espadas, G.F. y Santamaría, J.M. 2016. The papaya CpAUX1/LAX and CpPIN genes: Structure, phylogeny and expression analysis related to root formation on *in vitro* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 126: 187–204.
- Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P.W. y O’Connell, M.A. 2010. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Science*. 179(1-2): 49–59.
- Ha, S.H., Kim, J.B., Park, J.S., Lee, S.W. y Cho, K.J. 2007. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin–capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany*. 58: 3135–3144.
- Hwang, H.H., Chien, P.R., Huang, F.C., Yeh, P.H., Hung, S.W., Deng, W.L. y Huang, C.C. 2022. A plant endophytic bacterium *Priestia megaterium* strain BP-R2 isolated from the halophyte *Bolboschoenus planiculmis* enhances plant growth under salt and drought stresses. *Microorganisms*. 10(10): 2047.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiera, M., Hyodo, H. y Yano, M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol*. 134(1): 824–837.
- Katsenios, N., Andreou, V., Sparangis, P., Djordjevic, N., Giannoglou, M., Chanioti, S., Stergiou, P., Xanthou, M.-Z., Kakabouki, I., Vlachakis, D., *et al.* 2021. Evaluation of plant growth promoting bacteria strains on growth, yield and quality of industrial tomato. *Microorganisms*. 9: 2099.
- Ko, H.-C., Haile, M., Lee, S., Hwang, A., Lee, G.-A., Choi, Y.-M., Hahn, B.-S. y Ro, N. 2022. Correlation of carotenoids content and ASTA values of pepper (*Capsicum chinense*) Genetic Resources. *Horticulturae*. 8(6): 486.
- Krumm, A. 2019. Mida el crecimiento microbiano utilizando el “OD600”. The microplate Reader Company.

- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Mohd, H.N., Yusof, N.A., Yahaya, A.F., Mohd, R.N.N. y Othman, R. 2019. Carotenoids of *Capsicum* fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants*. 8: 469.
- Murillo, C.F.D., Cabrera, M.H., Adame, G.J., Vásquez, H.A., Martínez, G.A. y de J. Luria, M.R. 2021. Bioestimulantes en la calidad en la calidad de frutos de chile habanero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 12(18): 1473-1481.
- Oney-Montalvo, J.E., Avilés-Betanzos, K.A., Ramírez-Rivera, E.J., Ramírez-Sucre, M.O. y Rodríguez-Buenfil, I.M. 2020. Polyphenols content in *Capsicum chinense* fruits at different harvest times and their correlation with the antioxidant activity. *Plants (Basel)*. 9(10): 1394.
- Othman, R., Mohd Zaifuddin, F.A. y Hassan, N.M. 2014. Carotenoid biosynthesis regulatory mechanisms in plants. *Journal of Oleo Science*. 63(8): 753-760.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J. y Cubo, T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169(5-6): 325-336.
- Ro, N., Oh, H., Ko, H.C., Yi, J., Na, YW. y Haile, M. 2024. Genome-wide analysis of fruit color and carotenoid content in *Capsicum* core collection. *Plants*. 13(18): 2562.
- Rodríguez-Urbe, L., Guzman, I., Rajapakse, W., Richins, R.D. y O'Connell, M.A. 2019. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany*. 63(1): 517-526.
- Saxena, A., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N. y Bagyaraj, D. 2020. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*. 128: 1583-1594.
- Shanaida, M., Mykhailenko, O., Lysiuk, R., Hudz, N., Balwierz, R., Shulhai, A., Shapovalova, N., Shanaida, V. y Bjørklund, G. 2025. Carotenoids for antiaging: Nutraceutical, pharmaceutical, and cosmeceutical applications. *Pharmaceuticals*. 18(3): 403.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. y Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*. 2(587): 1-14.
- Wan, H., Yuan, W., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., Li, Z., Zhou, G., Yao, Z., Zhao, J., Liu, S. y Yang, Y. 2011. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 416(1-2): 24-30.
- Wang, T., He, Q., Wang, C., Li, Z., Sun, S., Yang, X., Yang, X., Deng, Y. y Hou, C. 2024. The expression profile of genes related to carotenoid biosynthesis in pepper under abiotic stress reveals a positive correlation with plant tolerance. *Life*. 14: 1659.
- Wellburn, R.A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 144: 307-313.
- Wu, X., Zhao, Z., Zhao, Z., Zhang, Y., Li, M. y Yu, Q. 2023. Analysis of the potassium-solubilizing *Priestia megaterium* strain NK851 and its potassium feldspar-binding proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 24: 14226.