

EXPRESSION OF HYDROXYMETHYLGLUTARYL-COA REDUCTASE 2 (*HMG2*) GENE IN CHILLI (*Capsicum annuum* L.) CM334 INFECTED BY *Nacobbus aberrans* AND *Phytophthora capsici*

EXPRESIÓN DEL GEN *HMG2* (HIDROXIMETILGLUTARIL-COA REDUCTASA 2) EN CHILE (*Capsicum annuum* L.) CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* Y *Phytophthora capsici*

Edgar Villar-Luna¹, Reyna I. Rojas-Martínez¹, Benito Reyes-Trejo², Mario Rocha-Sosa³, Emma Zavaleta-Mejía^{1*}

¹Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México (zavaleta@colpos.mx). ²Laboratorio de Productos Naturales. Área de Química. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. ³Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3. 62210. Cuernavaca, Morelos.

ABSTRACT

Plants of chilli *Capsicum annuum* L. CM334 show a high level of resistance to *Phytophthora capsici*, but are susceptible to *Nacobbus aberrans*; such resistance has been associated with capsidiol accumulation, a sesquiterpene phytoalexin. In the present study the expression of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase 2 gene (*HMG2*, associated with sesquiterpene phytoalexins biosynthesis) in CM334 chilli roots inoculated with *N. aberrans* and in combination with *P. capsici*, was determined by qRT-PCR. The levels of *HMG2* transcripts were significantly reduced ($p \leq 0.05$) from -1.57 to -1.28 -fold in the interaction CM334/*N. aberrans*; whereas in roots inoculated only with the oomycete, the accumulation of transcripts occurred earlier and at higher levels (1.52 to 3.54-fold). In plants inoculated with both pathogens, the expression was higher compared with those inoculated with the nematode only ($p \leq 0.05$), but generally lower than the expression observed in roots of plants inoculated with the oomycete alone. The expression of the *HMG2* gene associated with defense was reduced in CM334 chilli plants infected by *N. aberrans*.

Key words: *Capsicum annuum*, capsidiol, real-time PCR, root-knot nematodes.

INTRODUCTION

The oomycete *Phytophthora capsici* Leonian limits the production of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) worldwide (Erwin

RESUMEN

Plantas de chile *Capsicum annuum* L. CM334 exhiben un alto grado de resistencia a *Phytophthora capsici*, pero son susceptibles a *Nacobbus aberrans*; tal resistencia se ha asociado con la acumulación de capsidiol, una fitoalexina sesquiterpénica. En el presente estudio se determinó mediante qRT-PCR los niveles de expresión del gen *HMG2* (hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2, asociado con la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas) en raíces de chile CM334 inoculadas con *N. aberrans* y en combinación con *P. capsici*. Los niveles de transcritos de *HMG2* fueron significativamente reducidos ($p \leq 0.05$) de -1.57 a -1.28 veces en la interacción CM334/*N. aberrans*; mientras que en raíces inoculadas sólo con el oomiceto la acumulación de transcritos fue temprana e intensa (1.52 a 3.54 veces). En plantas inoculadas con ambos patógenos, la expresión fue alta comparada con aquellas inoculadas sólo con el nematodo ($p \leq 0.05$), pero generalmente menor que la expresión observada en raíces inoculadas sólo con el oomiceto. La expresión del gen *HMG2* (asociado con defensa) fue reducida en raíces de chile CM334 infectadas por *N. aberrans*.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, capsidiol, PCR en tiempo real, nematodos agalladores

INTRODUCCIÓN

El oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian limita la producción de chile (*Capsicum annuum* L.) en el mundo (Erwin y Ribeiro, 1996), en el campo y en invernadero. La utilización de genotipos resistentes al oomiceto es una estrategia económica y ambientalmente amigable para el manejo de

* Autora responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2014. Aprobado: diciembre, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 69-75. 2015.

and Ribeiro, 1996) in the field and greenhouse. The use of genotypes resistant to the oomycete is an economic and environmentally friendly strategy for disease management. The landrace Criollo de Morelos 334 (CM334) displays a high level of resistance to multiple isolates of *P. capsici*, which is expressed as a hypersensitive response in root, stem and foliage (Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006).

Plant defense mechanisms commonly involve the transcriptional activation of several defense-related genes; such activation leads to the *de novo* synthesis of a variety of proteins and antimicrobial compounds. In chilli plants, defense-related genes *HMG2* (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase), *SC* (sesquiterpene cyclase) and *EAS* (5-epiaristolochene synthase), which are involved in the biosynthesis of sesquiterpenic phytoalexins such as capsidiol, are over-expressed in response to attack by *P. capsici* (Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012).

The hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR) catalyzes the mevalonate synthesis, is encoded by a multigene family that in *C. annuum* includes *HMG1*, *HMG2*, and *HMG3* (Ha *et al.*, 2003). In plants, these genes are differentially regulated and lead to the biosynthesis of different types of isoprenoids; thus, in *Arabidopsis thaliana*, the expression of *HMG1* and *HMG2* is associated with sterols and triterpenes biosynthesis (Ohyama *et al.*, 2007). Also, in *Solanum tuberosum* *HMG1* is associated with sterol biosynthesis, whereas *HMG2* and *HMG3* are involved in sesquiterpene phytoalexins biosynthesis in response to attacks by pathogens (Choi *et al.*, 1992).

Even though CM334 is highly resistant to the oomycete, the plants show susceptibility when they were previously infected by the nematode *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). This phenomenon is associated with transcriptional and metabolic changes induced by the nematode in the root, including those pathways involved in defense (López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). In susceptible hosts, root-knot nematodes induce the formation of specialized feeding sites (SFS), a process that involves the down-regulation and up-regulation of genes. For instance, in the interaction *Meloidogyne incognita*/*A. thaliana*, genes involved in jasmonic acid/ethylene-dependent defense pathways and those involved in the

esta enfermedad. La línea de Chile Criollo de Morelos 334 (CM334) exhibe un alto grado de resistencia a múltiples aislamientos de *P. capsici*, la cual se expresa como una respuesta hipersensitiva en raíz, tallo y follaje (Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006).

Los mecanismos de defensa de las plantas generalmente implican la activación transcripcional de varios genes; tal activación conduce a la síntesis *de novo* de una variedad de proteínas y compuestos antimicrobianos. En plantas de Chile, los genes de defensa *HMG2*, *SC* y *EAS* (hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2, sesquiterpeno ciclasa, y 5-epiaristolocheno sintasa, respectivamente), implicados en la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol, son sobrexpresados en respuesta al ataque por *P. capsici* (Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012).

La enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) cataliza la síntesis del mevalonato y es codificada por una familia multigénica que en *C. annuum* incluye a *HMG1*, *HMG2*, y *HMG3* (Ha *et al.*, 2003). En plantas, estos genes son diferencialmente regulados y conducen a la biosíntesis de diferentes tipos de isoprenoides; así, en *Arabidopsis thaliana*, la expresión de *HMG1* y *HMG2* está asociada con la biosíntesis de esteroides y triterpenos (Ohyama *et al.*, 2007). También en *Solanum tuberosum*, *HMG1* se asocia con la biosíntesis de esteroides, mientras que *HMG2* y *HMG3* están relacionados con la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas en respuesta al ataque por patógenos (Choi *et al.*, 1992).

Aunque CM334 es altamente resistente al oomiceto, las plantas muestran susceptibilidad cuando son infectadas previamente por el nematodo agallador *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944 (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Este fenómeno está asociado con cambios transcripcionales y metabólicos inducidos por el nematodo en la raíz, incluyendo aquellas rutas implicadas en defensa (López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Los nematodos agalladores inducen la formación de sitios especializados de alimentación (SEA) en hospedantes susceptibles, proceso que involucra la represión y sobrexpresión de genes. Por ejemplo, en la interacción *Meloidogyne incognita*/*Arabidopsis thaliana*, ocurrió la represión local de genes asociados con las rutas de defensa dependientes del ácido jasmónico y etileno, y síntesis de compuestos antimicrobianos; en contraste, se sobrexpresaron aquellos relacionados con la

synthesis of compounds with antimicrobial potential were down-regulated locally; in contrast, those related to the differentiation and maintenance of the SFS were up-regulated (Jammes *et al.*, 2005). In CM334 chilli roots infected by *N. aberrans* and inoculated with *P. capsici*, there was a delay in *EAS* transcripts accumulation in comparison to those inoculated only with the oomycete; this event was related to a reduced accumulation of capsidiol (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Based on this background, it is feasible to speculate that a reduction in the expression of defense-related genes could facilitate the establishment and successful reproduction of *N. aberrans* in CM334 plants, conditions that could be favorable for the infection by *P. capsici*. To contribute to the knowledge about the transcriptional changes induced during the complex interactions between the sedentary plant parasitic nematodes and their host plants, the aim of the present study was to determine the transcripts accumulation of the *HMG2* gene in CM334 plants roots inoculated with *N. aberrans* alone and in combination with *P. capsici*.

MATERIALS AND METHODS

Chilli plants and inoculation with *N. aberrans* and *P. capsici*

CM334 chilli plants were grown singly into pots containing 25 cm³ of sterile sand. The inoculum preparation, inoculation and time of inoculation were according to Fernández-Herrera *et al.* (2012).

Assay establishment

Treatments were: 1) non-inoculated CM334 plants (control); 2) CM334 plants inoculated with *P. capsici* (*Pc*, 300 000 zoospores per plant); 3) CM334 plants inoculated with *N. aberrans* (*N*, 2000 second-stage juveniles, *J*₂); 4) CM334 plants inoculated with both pathogens (*NPe*); each treatment had 45 plants. At 6, 12 and 24 h after inoculation with the oomycete (*haio*), for each treatment and time the roots of 15 plants were frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C. The experiment was repeated once.

RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen root tissues using the RNeasy™ Plant mini kit and including a DNase treatment (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The purity

diferenciación y mantenimiento del SEA (Jammes *et al.*, 2005). En plantas de chile CM334 infectadas por *N. aberrans* e inoculadas con *P. capsici*, se observó una acumulación tardía de transcritos del gen *EAS*, en comparación con las inoculadas sólo con el oomiceto, lo cual se relacionó con una menor acumulación de capsidiol (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Con base en estos antecedentes, es factible especular que la reducción en la expresión de genes relacionados con defensa podría facilitar el establecimiento y reproducción exitosa de *N. aberrans* en chile CM334, condición que podría ser favorable para la infección por *P. capsici*. Para contribuir al conocimiento sobre los cambios transcripcionales inducidos durante la compleja interacción entre nematodos sedentarios y sus hospedantes, el objetivo del presente estudio fue determinar la acumulación de transcritos del gen *HMG2* en raíces de chile CM334 inoculadas solo con *N. aberrans* y en combinación con *P. capsici*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas de chile e inoculación con *N. aberrans* y *P. capsici*

Plantas de chile CM334 crecieron individualmente en macetas conteniendo 25 cm³ de arena estéril. La preparación del inóculo, la inoculación y tiempos de incubación, fue de acuerdo con Fernández-Herrera *et al.* (2012).

Establecimiento del experimento

Los tratamientos fueron: 1) plantas CM334 sin inoculación (testigo); 2) plantas CM334 inoculadas con *P. capsici* (*Pc*, 300 000 zoosporas por planta); 3) plantas CM334 inoculadas con *N. aberrans* (*N*, 2000 juveniles de segundo estadio, *J*₂); 4) plantas CM334 inoculadas con ambos patógenos (*NPe*); cada tratamiento tuvo 45 plantas. A las 6, 12 y 24 h después de inocular con el oomiceto (*hpio*), para cada tratamiento y tiempo, se tomaron 15 plantas y las raíces se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. El experimento se repitió una vez.

Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real

ARN total se extrajo de raíces congeladas usando el RNeasy™ Plant mini kit incluyendo un tratamiento con DNasa (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza e integridad del ARN se verificó por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) y mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante a 1.2 %, respectivamente. La síntesis de cDNA

and integrity of RNA was verified by spectrophotometry (ND-1000, Nanodrop Technologies) (Thermo Scientific, USA) and by 1.2 % denaturing agarose gel electrophoresis, respectively. First-strand cDNA was synthesized from 2 μg of total RNA using the oligo(dT₁₅) primer (Promega) and M-MLV reverse transcriptase (Promega) according to manufacturer's instructions.

The expression levels of *HMG2* gene (AF110383) were determined by real-time PCR in the ABI7500™ system (Applied Biosystems) using the following primers: 5'-ATTACCTTCAGAATGAATACGCT-3' (forward) y 5'-CTCTCTATGTTTTGTGCTGGGT-3' (reverse). The reaction mixture consisted of buffer 10X, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 μM of each primer, 0.2 mM dNTPs, amplificase (Biotecmol), SYBR™ Green I (1: 75000) (Molecular Probes, Eugene, OR) as the reporter fluorophore, 10 nM fluorescein as passive reference, 2 μL cDNA, and nuclease-free water were added to a final volume of 25 μL . Amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 35 s, and extension at 72 °C for 35 s; the data were collected during the extension step. Dissociation curve analysis was performed to rule out amplification of non-specific products. Six technical replicates were performed for each treatment and each time. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (AJ246011) [5'-GGCCTTATGACTACAGTTCCTCC-3' (forward) y 5'-GATCAACCACAGAGACATCCACAG-3' (reverse)] was used as internal reference to normalize expression level, and control plants to calibrate expression levels of *HMG2* gene, which was expressed as fold-change due to treatment in relation to the transcript basal levels in control plants (1x). Relative expression was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} method (Schmittgen and Livak, 2008). PCR products were purified with QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and sequenced to confirm their identity.

An ANOVA was performed with the data (fold-change), the experimental design was completely randomized, and when significant differences were detected, the means of treatments were compared using Tukey's test ($p \leq 0.05$). These procedures were performed in SAS version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

At all times, the *HMG2* transcript levels were significantly reduced ($p \leq 0.05$) from -1.57 to -1.28-fold, in CM334 plant roots infected by *N. aberrans* alone (*N* treatment) and they were below the basal expression in control plants (Figure 1). In contrast, plant roots inoculated with *P. capsici* only (*Pc* treatment) showed the highest levels of expression

se realizó desde 2 μg de ARN total usando oligo(dT₁₅) primer (Promega) y la enzima M-MLV reverse transcriptase (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles de expresión del gen *HMG2* ((AF110383) se determinaron mediante PCR en tiempo real (ABI7500™ system, Applied Biosystems) usando el par de oligonucleótidos: 5'-ATTACCTTCAGAATGAATACGCT-3' (forward) y 5'-CTCTCTATGTTTTGTGCTGGGT-3' (reverse). La mezcla de reacción consistió de amortiguador 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.4 μM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTPs, amplificasa (Biotecmol), SYBR™ Green I (1:75000) (Molecular Probes, Eugene, OR) como fluoróforo reportero, 10 nM de fluoresceína como referencia pasiva, 2 μL de cDNA, y agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 μL . Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 15 s, alineamiento a 60 °C por 35 s, y una extensión a 72 °C por 35 s; los datos se recolectaron durante el paso de extensión. Un análisis de disociación se incluyó para descartar la formación de productos inespecíficos. Cada tratamiento y cada tiempo tuvo seis réplicas técnicas. Se usó el gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (AJ246011) [5'-GGCCTTATGACTACAGTTCCTCC-3' (forward) y 5'-GATCAACCACAGAGACATCCACAG-3' (reverse)], como gen de referencia interna para normalizar los niveles de expresión, y las plantas testigo para calibrar la expresión del gen *HMG2*, el cual se expresó como cambios en "veces" debido al tratamiento con relación al nivel basal registrado en las plantas testigo (1x). La expresión relativa se calculó usando el método 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} (Schmittgen y Livak, 2008). Los productos de PCR fueron purificados con el QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron para confirmar su identidad.

Con los datos (cambios en veces) se realizó un ANDEVA, el diseño experimental fue completamente al azar, y cuando se detectaron diferencias significativas, las medias de los tratamientos fueron comparados con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), usando el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los tiempos de evaluación, los niveles de transcritos del gen *HMG2* fueron reducidos significativamente ($p \leq 0.05$) de -1.57 a -1.28 veces en raíces de plantas infectadas sólo con *N. aberrans* (tratamiento *N*), y fueron inferiores a los niveles de expresión basal en las plantas testigo (Figura 1). En contraste, raíces inoculadas sólo con *P. capsici* (tratamiento *Pc*) mostraron los niveles de expresión más altos (1.52 a 3.54 veces) ($p \leq 0.05$); en esta interacción

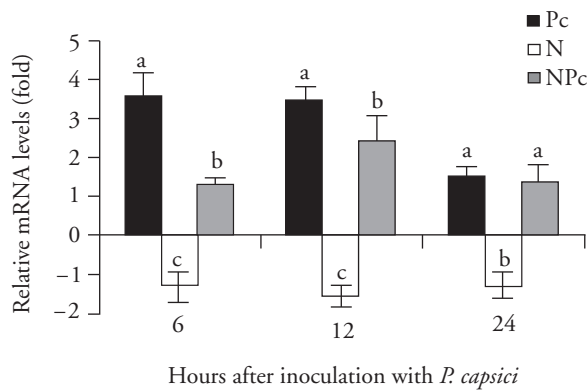


Figure 1. Relative transcript accumulation of HMG2 in CM334 chili plant roots resistant to *Phytophthora capsici*. Pc: inoculated with *P. capsici* alone; N: inoculated with *Nacobbus aberrans* alone; NPc: inoculated with *N. aberrans* and *P. capsici*. Each bar represents the average of six technical replicates and the line in each bar the standard deviation. Bars with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$). The experiment was repeated once.

Figure 1. Acumulación relativa de transcritos de HMG2 en raíces de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; N: inoculadas sólo con *Nacobbus aberrans*; NPc: inoculadas con *N. aberrans* y *P. capsici*. Cada barra representa el promedio de seis réplicas técnicas y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con diferente letra son diferentes significativamente (Tukey, $p \leq 0.05$). El experimento se repitió una vez.

(1.52 to 3.54-fold) ($p \leq 0.05$); in this incompatible interaction (CM334-*P. capsici*), the maximum expression of the gene was observed at 6 hpio (3.54-fold) and then decreased.

At 6 and 12 hpio the transcript levels were reduced by 1.30 to 2.44-fold ($p \leq 0.05$) in plants inoculated with both pathogens (NPc treatment) as compared to those in plants of the Pc treatment (1.52 to 3.54-fold), but at 24 hpio the reduction was not significant in comparison to the plants inoculated with the oomycete alone. In plants of the NPc treatment there was a delay in the expression of the gene, as the maximum expression of HMG2 was observed until the 12 hpio (2.44-fold) and decreased at 24 hpio (Figure 1).

The hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR) catalyzes the first committed step of the mevalonate pathway for phytosterol and sesquiterpene biosynthesis; in plants, it is encoded by

incompatible (CM334-*P. capsici*), la máxima expresión se observó a las 6 hpio (3.54 veces) y luego disminuyó.

A 6 y 12 hpio, los niveles de transcritos se redujeron de 1.30 a 2.44 veces ($p \leq 0.05$) en plantas inoculadas con ambos patógenos (tratamiento NPc) comparadas con las del tratamiento Pc (1.52 a 3.54 veces), pero a 24 hpio la reducción no fue significativa. En plantas del tratamiento NPc hubo un retraso en la expresión del gen, ya que la máxima expresión fue observada hasta las 12 hpio (2.44 veces) y disminuyó a las 24 hpio (Figura 1).

La enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) cataliza el primer paso comprometido de la ruta del mevalonato para la biosíntesis de esteroides y sesquiterpenos; en plantas es codificada por los genes HMG, una familia multigénica que en *C. annuum* incluye a HMG1, HMG2 y HMG3 (Ha *et al.*, 2003). Estos genes son diferencialmente expresados durante el desarrollo de la planta y en respuesta a patógenos u otros tipos de estrés, por esta particularidad, HMGR es crítica en la canalización metabólica de intermediarios de la ruta hacia productos finales específicos, tales como fitoesteroides y sesquiterpenos, estos últimos con propiedades antimicrobianas (Weissenborn *et al.*, 1995). En el presente estudio, las plantas de chile CM334 del tratamiento Pc generalmente exhibieron altos niveles de transcritos de HMG2. Este resultado es consistente con lo reportado por Ha *et al.* (2003), quienes también encontraron que el incremento en la expresión de HMG2 estuvo relacionado con una fuerte expresión del gen SC (sesquiterpeno ciclasa) en *C. annuum* cv. NocKwang inoculado con *P. capsici*. Estos investigadores sugieren que la regulación coordinada de ambos genes podría estar asociada con la acumulación de fitoalexinas sesquiterpénicas en respuesta a la infección. A las 6 hpio fue evidente que en plantas del tratamiento NPc, hubo una acumulación inferior de transcritos de HMG2 en comparación con el tratamiento Pc, mientras que en plantas del tratamiento N, los niveles registrados fueron los más bajos. Este comportamiento fue el esperado, ya que *N. aberrans* establece una interacción compatible con el chile CM334. En varios genotipos de chile, incluyendo a CM334, la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol se asocia con la resistencia a *P. capsici* (Candela *et al.*, 2000) y el capsidiol también es tóxico para *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2010). Estos reportes indican que la alteración en los

HMG genes, a multigene family that in *C. annuum* L. includes *HMG1*, *HMG2*, and *HMG3* (Ha *et al.*, 2003). These genes are differentially expressed during plant development and in response to pathogens or other stresses, for this particularity, HMGR is critical in the metabolic channeling of pathway intermediates towards specific end products, such as phytosterol and sesquiterpene metabolites, these last with antimicrobial properties (Weissenborn *et al.*, 1995). In the present study, CM334 chilli plants of the *Pc* treatment, generally exhibited high levels of *HMG2* transcripts. This result is consistent with that reported by Ha *et al.* (2003), who also found that increased expression of *HMG2* was related with a strong expression of *SC* gene (sesquiterpene cyclase) in *C. annuum* cv. NocKwang inoculated with *P. capsici*; these researchers suggest that the coordinated regulation of both genes could be related with sesquiterpene phytoalexin accumulation in response to the infection. At 6 haio was evident that plants of the *NPc* treatment, had lower accumulation of *HMG2* transcripts compared to *Pc* treatment, whereas in plants infected by the nematode alone, the levels recorded were lowest. This behavior was expected, since *N. aberrans* establishes a compatible interaction with chilli CM334. In several genotypes of chilli pepper, including CM334, the sesquiterpene phytoalexin capsidiol is associated with resistance to *P. capsici* (Candela *et al.*, 2000), and capsidiol is also toxic to *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2010). These reports indicate that changes in gene-expression patterns of *HMG2* might consequently result in a reduced accumulation of sesquiterpene phytoalexins such as capsidiol, which in turn could promote the establishment and successful reproduction of *N. aberrans* and *P. capsici* in chilli CM334.

Like *Meloidogyne*, *Heterodera*, and *Globodera* species, *N. aberrans* induces the formation of specialized feeding sites (SFS) to obtain essential nutrients for its development and reproduction (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Morphological changes in host root cells during the differentiation of these sites (giant cells or syncytia) are accompanied by drastic alteration in gene-expression patterns, inducing profound modifications in normal metabolism (Jammes *et al.*, 2005). Down-regulation of genes involved in jasmonic acid/ethylene-dependent defense pathways, and also those involved in the synthesis of antimicrobial compounds, was

patrones de expresión de *HMG2*, puede repercutir en una reducida acumulación de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol, lo cual favorecería el establecimiento y reproducción exitosa de *N. aberrans* y *P. capsici* en chilli CM334.

Al igual que *Meloidogyne*, *Heterodera*, y *Globodera*, *N. aberrans* induce la formación de sitios especializados de alimentación (SEA) para obtener de nutrientes necesarios para su desarrollo y reproducción (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Los cambios morfológicos de las células hospedantes durante la diferenciación de estos sitios (células gigantes o sincitios) son acompañados de una drástica alteración en los patrones de expresión génica en la planta, modificando profundamente el metabolismo normal (Jammes *et al.*, 2005). En interacciones compatibles planta-nematodo se ha reportado la represión de genes asociados con las rutas de defensa dependientes del ácido jasmónico y etileno, y síntesis de compuestos antimicrobianos; en contraste, aquellos relacionados con la diferenciación y mantenimiento del SEA se sobrepresan (Jammes *et al.*, 2005). Por ejemplo, *Heterodera glycines* redujo la expresión de los genes *OPR1* y *OPR2* relacionados con la biosíntesis de ácido jasmónico en un cultivar susceptible de *Glycine max* (Ithal *et al.*, 2007). En otras interacciones compatibles, como la de *A. thaliana*-*M. incognita* ocurrió la represión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) y para factores de transcripción WRKY involucrados en defensa (Jammes *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Nacobbus aberrans redujo la expresión del gen *HMG2* y tal reducción fue de mayor magnitud cuando las plantas CM334 fueron inoculadas únicamente con el nematodo, en comparación con las inoculadas con ambos patógenos, *N. aberrans* y *P. capsici*.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

reported in compatible plant-nematode interactions; in contrast, those related to the differentiation and maintenance of the SFS are up-regulated (Jammes *et al.*, 2005). For instance, *Heterodera glycines* reduced

the expression of *OPR1* and *OPR2* genes related to the jasmonic acid biosynthesis in a susceptible cultivar of *Glycine max* (Ithal *et al.*, 2007). The down-regulation of defense genes that encode for pathogenesis-related proteins (PRs) and for WRKY transcription factors was reported by Jammes *et al.* (2005) in other compatible interactions, such as *A. thaliana*-*M. incognita*.

CONCLUSIONS

Nacobbus aberrans reduced the expression of *HMG2* gene and such reduction was of greater magnitude when CM334 plants were infected only with the nematode in comparison to those inoculated with the two pathogens, *N. aberrans* and *P. capsici* or *P. capsici*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Council on Science and Technology (CONACYT) for the scholarship granted to the first author and the financial support for the development of this investigation (Project 46331 Z-CONACYT) and Dr. Rosa Luisa Santillán-Baca for reviewing the manuscript.

LITERATURE CITED

- Candela, M. E., C. Egea, M. D. García-Pérez, J. Costa, and M. Candela. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Hort.* 522: 79-86.
- Choi, D., B. L. Ward, and R. M. Bostock. 1992. Differential induction and suppression of potato 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4: 1333-1344.
- Erwin, D. C., and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 562 p.
- Fernández-Herrera, E., R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, M. E. Rivas-Dávila, E. Valadez-Moctezuma, y E. Zavaleta-Mejía. 2012. Defensa en Chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 42: 96-107.
- Godínez-Vidal, D., M. Soto-Hernández, M. Rocha-Sosa, E. Lozoya-Gloria, R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, y E. Zavaleta-Mejía. 2010. Contenido de capsidiol en raíces de Chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40: 227-237.
- Ha, S. H., J. B. Kim, Y. S. Hwang, and S. W. Lee. 2003. Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochim. Biophys. Acta* 1625: 253-260.
- Ithal, N., J. Recknor, D. Nettleton, T. Maier, T. J. Baum, and M. G. Mitchum. 2007. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 510-525.
- Jammes, F., P. Lecomte, J. A. Engler, F. Bitton, M. L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad, and B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *Plant J.* 44: 447-458.
- López-Martínez, N., M. T. Colinas-León, C. B. Peña-Valdivia, Y. Salinas-Moreno, P. Fuentes-Montiel, M. Biesaga, and E. Zavaleta-Mejía. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* 338: 399-409.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserra, P. S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32: 150-227.
- Ohyama, K., M. Suzuki, K. Masuda, S. Yoshida, and T. Muranaka. 2007. Chemical phenotypes of the *hmg1* and *hmg2* mutants of *Arabidopsis* demonstrate the *In-planta* role of HMG-CoA reductase in triterpene biosynthesis. *Chem. Pharm. Bull.* 55: 1518-1521.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3: 1101-1108.
- Silvar, C., F. Merino, and J. Díaz. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 165: 1120-1124.
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, y J. R. Lara. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35: 37-44.
- Ueeda, M., M. Kubota, and K. Nishi. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67: 149-154.
- Weissenborn, D. L., C. J. Denbow, M. Laine, S. S. Lang, Z. Yang, X. Yu, and C. L. Cramer. 1995. HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiol. Plant.* 93: 393-400.