

PcSec62 参与调控辣椒疫霉生长发育及致病性

黄玉媛[#], 叶倩倩, 陈庆河*, 梁启福*

(海南大学 三亚南繁研究院/热带农林学院, 海南 三亚 572025 中国)

摘要: 内质网是真核细胞蛋白加工的重要场所, *Sec62* 作为内质网易位复合体的重要组成部分, 在机体生长发育及应激调节过程中具有重要作用。本研究对不同生育阶段及致病过程 *PcSec62* 基因转录水平进行检测, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑获得辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) *PcSec62* 基因敲除突变体 $\Delta Pcsec62$ 及回补菌株 $\Delta Pcsec62$ -C, 以野生型及空载菌株为对照, 对突变体进行生物表型分析。结果显示, 孢子囊及侵染阶段 *PcSec62* 转录表达显著增高, $\Delta Pcsec62$ 突变体生长及产孢能力显著下降, 且菌丝极性生长受阻膨大体显著增多; 同时 $\Delta Pcsec62$ 菌株对于非生物胁迫的耐受能力和致病能力显著下降。上述结果表明 *PcSec62* 参与调控辣椒疫霉生长、发育、非生物胁迫响应及致病性过程。

关键词: 辣椒疫霉; *PcSec62*; 内质网应激; 生长及发育; 致病性

中图分类号: Q789 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2026)02-0314-10

黄玉媛, 叶倩倩, 陈庆河, 等. *PcSec62* 参与调控辣椒疫霉生长发育及致病性[J]. 热带生物学报(中

英文), 2026, 17(2): 314–323. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240170 CSTR: 32425.14.j.cnki.

rdswwb.20240170



辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 是一种极具破坏性的作物卵菌, 对辣椒种植造成巨大的经济损失^[1]。辣椒疫霉寄主广泛、传播迅速、易产生抗/耐药性^[2-4], 以及分泌大量酶或效应蛋白促进病原菌侵染致病, 造成严重的辣椒疫病防控障碍。内质网是真核细胞分泌蛋白与膜蛋白合成加工的重要场所。已有报道显示, 病原菌分泌蛋白(包括效应子)经内质网加工与修饰对病原菌的致病力至关重要^[5-7]。*Sec62* 作为易位复合体的重要成员, 在促进蛋白质前体向内质网转运过程中起关键作用^[8-10]。它通过末端 EF 基序与 *Sec61* 互作, 形成 V 型结构调控 *Sec61* 蛋白通道, *Sec62* 缺失后引起 *Sec61* 蛋白通道变窄处于非活动状态, 导致细胞对内质网应激敏感性增加^[11-14]。近期研究发现, *Sec62* 可作为内质网自噬受体, 在内质网应激的恢复阶段被激活, 参与组织生长发育和内质网稳态调节^[15-16]。*AtSec62* 在拟南芥中参与调控植

物的生长发育, *Atsec62* 缺失后导致植物生长发育延缓、花粉形态异常, 且育性降低; *Atsec62* 过表达会增强植物对内质网应激的耐受性^[17-18]; 稻瘟菌 *MoSec62* 是酵母内质网膜转运蛋白 *Sec62p* 的同源蛋白, *MoSec62* 缺失后稻瘟菌突变菌株 M1575 致病力完全丧失, 同时 *MoSec62* 也可以回补酿酒酵母 *sec62* 缺失导致的温度敏感性^[19]。然而, 辣椒疫霉中尚未见 *PcSec62* 的相关研究报道, *PcSec62* 是否参与调控辣椒疫霉胁迫响应、生长及致病有待研究。本研究中, 本研究团队对 *PcSec62* 进行基因功能分析, 系统研究 *PcSec62* 在调节辣椒疫霉生长、发育、非生物胁迫响应和致病性方面的作用。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、辣椒及载体 本研究所用的辣椒疫霉野生型菌株 LT1534, 大肠杆菌 (*Escherichia*



收稿日期: 2024-11-10

修回日期: 2024-12-05

基金项目: 海南大学科研启动基金项目(KYQD(ZR)23022); 国家自然科学基金青年项目(32302311); 研究生创新科研课题(Qhys2023-225)

[#]第一作者: 黄玉媛(2000—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 15379340211@163.com

*通信作者: 陈庆河(1971—), 男, 研究员。研究方向: 热带作物疫病菌致病机制及与寄主互作。E-mail: qhchen@hainanu.edu.cn

梁启福(1988—), 男, 副教授。研究方向: 植物病原微生物致病机理及病原与寄主互作。E-mail: qifuliang@hainanu.edu.cn

coli)菌株 DH5 α 由本实验室保存; 试验辣椒品种 HUNCB226 由海南大学汪志伟教授团队馈赠; 基因编辑载体 pYF515 与 pBlucscript II KS+(pBS) 由本实验室保存。

1.2 qRT-PCR 检测辣椒疫霉 *PcSec62* 的相对表达量 新活化至稳定生长的 LT1534 菌株转接至 TA 液体培养基 [TA 培养基: 过滤番茄汁 300 mL, 加入纯水定容至 3 L, 并加入 3.5 g 碳酸钙(CaCO_3)], 25 $^{\circ}\text{C}$ 120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 3 d 后收集菌丝体; 同时将 V8 平板(V8 培养基: 过滤 V8 果汁 300 mL, 加入纯水定容至 3 L, 并加入 3.5 g CaCO_3 , 每升加 15 g 琼脂粉)上培养 3 d 的 LT1534 进行光照诱导产孢 3~5 d, 收集孢子囊及游动孢子。取直径 5 mm 的菌丝块接种至 5~6 片真叶龄期的辣椒叶片上, 置于黑暗条件侵染 24 h, 移去菌丝块按正常光周期培养; 从接种开始计时, 收集侵染 12、24、48 和 72 h 的叶片样本。利用 RNA 提取试剂盒提取菌丝体、孢子囊、游动孢子及侵染叶片样本总 RNA 并测定浓度, 取 1 μg 总 RNA 利用逆转录试剂盒反转录为 cDNA。用 NCBI 在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计 *PcSec62* 特异性 qPCR 引物 qPCR-F 和 qPCR-R(表 1), 以 cDNA 为模板 Tublin B 为内参, 用 qPCR-F 和 qPCR-R 进行 qRT-PCR 定量检测, 每个样品试验重复 3 次, 每组样品 3 个生物学重复, 扩增结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算其相对表达量^[20], 并进行单因素方差显著性统计分析。

1.3 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除与回补 *PcSec62* 基因 参照 Wang 等^[21] 和 Qiu 等^[22] 的方法, 用 EuPaGDT 在线网站(http://grna.ctegd.uga.edu/batch_tagging.html)及 Primer 5.0 设计试验所需引物(表 1)。经体外合成 Sec62-sgRNA₁ 与 Sec62-sgRNA₂ 双链片段, 利用 T4 DNA 连接酶将其连接到 sgRNA 表达载体 pYF515; 以 LT1534 基因组 DNA 为模板扩增 *PcSec62* 上下游 1 000 bp 同源臂, 同时扩增潮霉素磷酸转移酶(Hygromycin phosphotransferase, HPH)基因片段; 将扩增获得的片段连接到 pBS 载体上。制备 LT1534 原生质体, 通过 PEG 介导法将重组 pYF515 及 pBS 质粒转入原生质体; 过夜黑暗培养后加入含终浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素(ampicillin)、60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 遗传霉素(G418)的 PAM 培养基(PM/PAM 培养

基: 取 700 mL 豌豆汁, 加入 91.1 g D-mannitol, 1 g CaCl_2 , 2 g CaCO_3 , 用纯水定容至 1 L, 每升加 15 g 琼脂粉), 待长出菌丝后加入含终质量浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ G418 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 V8 培养基继续培养, 至平板表面长出菌丝后挑取转化子进行 PCR 验证, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序分析。

参照上述基因敲除方法, 合成 HPH-sgRNA₁ 与 HPH-sgRNA₂, 连接到 pYF515 载体, 同时以 LT1534 基因组 DNA 为模板扩增 *PcSec62* 上下游同源臂与 *PcSec62* 片段连接到 pBS 载体, 获得重组载体。通过 PEG 介导法将重组 pYF515 和 pBS 载体转入辣椒疫霉 $\Delta Pcsec62$ 的原生质体中, 通过 G418 及氨苄抗性筛选回补转化子, 并进行 PCR 验证及测序分析, 获得回补菌株 $\Delta Pcsec62\text{-C}$ 。

1.4 *PcSec62* 基因敲除突变体与回补体生长速率测定及菌丝形态观察 取直径 5 mm 辣椒疫霉野生型 LT1534、pBS 和 pYF515 空载体(empty vector, EV)转化菌株 EV、突变体 $\Delta Pcsec62$ 及回补菌株 $\Delta Pcsec62\text{-C}$ 的菌丝块转接至 V8 培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养, 每 12 h 测量 1 次菌落直径, 72 h 拍照记录, 每个处理 3 个生物学重复。分别将供试菌株转接至 TA 液体培养基静置培养 3 d, 用光学显微镜 10 \times 和 40 \times 倍镜观察菌丝形态, 统计 100 根菌丝每 200 μm 菌丝膨大体的数量, 并进行单因素方差显著性统计分析。

1.5 产孢能力测定 将辣椒疫霉菌株 LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62\text{-C}$ 培养平板进行光照诱导产孢, 3 d 后收集孢子囊, 制备悬浮液过滤并定容至 1 mL。吸取 10 μL 孢子囊悬浮液至血球计数板上计数。每个供试菌株 3 个生物学重复, 每管孢子囊悬浮液计数 3 次, 通过单因素方差分析法进行显著性统计分析。

1.6 胁迫耐受能力测定 分别将盐胁迫剂氯化钠(NaCl)、钾离子胁迫剂氯化钾(KCl)、细胞膜胁迫剂十二烷基硫酸钠(SDS)、渗透胁迫剂山梨醇(Sorbitol)、内质网胁迫剂二硫苏糖醇(DTT)和细胞壁胁迫剂刚果红(CR)添加至 V8 培养基中, 分别调整终质量分数为 0.2% NaCl、0.2% KCl、0.004% SDS、0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Sorbitol、0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CR^[23-25]。将辣椒疫霉菌株 LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62\text{-C}$ 转接至含

表 1 试验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiment

名称 Primer	序列(5'—3') Sequences (5'—3')	用途 Amplification
Sec62-sgRNA ₁ F	CTAGCAGAGGACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACG AGTAAGCTCGTCGTCCTCTATTCATACTGCAGA	pYF515载体
Sec62-sgRNA ₁ R	AAACTATGCAGTATGAATAGAGGAGACGAGCTTAC TCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGTGCAGAG	pYF515载体
Sec62-sgRNA ₂ F	CTAGCTCCTCGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAC GAGTAAGCTCGTCCGAGGATGAAGTGGTAGACC	pYF515载体
Sec62-sgRNA ₂ R	AAACGGTCTACCACTTCATCCTCGGACGAGCTTA CTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGCGAGGAG	pYF515载体
HPH-sgRNA ₁ F	CTAGCCGGAATCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAA GCTCGTCATTCCGGAAGTGCTTGACAT	pYF515载体
HPH-sgRNA ₁ R	AAACATGTCAAGCACTTCCGGAATGACGAGCTTACTCGTTT CGTCTCACGGACTCATCAGATTCCGG	pYF515载体
HPH-sgRNA ₂ F	CTAGCTTGTCCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGT AAGCTCGTCGGACAATGGCCGCATAACAG	pYF515载体
HPH-sgRNA ₂ R	AAACCTGTTATGCGGCCATTGTCGACGAGCTTACTCGT TTCGTCCTCACGGACTCATCAGGGACAAG	pYF515载体
AF	TATCGATAAGCTTGATATCG CACGAACAGCGAGGCTTTC	pBS载体
AR	GTGAGTTCAGGCTTTTTCAT AGTGCTCCAAAAGGTTCTG	pBS载体
BF	CCGAGGGCAAAGGAATAG ACGGCACCCCTAGTAGGCAG	pBS载体
BR	CGGCCGCTCTAGAAGTATG ATGCTGACATGGGTGTGG	pBS载体
HPHF	ATGAAAAAGCCTGAACTC	HPH片段扩增、PCR验证
HPHR	CTATTCCTTTGCCCTCGG	HPH片段扩增、PCR验证
ORF-F	TCCGCAAGATGGCTGACT	<i>PcSec62</i> 片段扩增、PCR验证
ORF-R	ACTCGTCAAAGTCCGTGGG	<i>PcSec62</i> 片段扩增、PCR验证
qPCR-F	TGGGAGACGGAGAAGGGA	qPCR 检测
qPCR-R	CTAAACGGTCGCCACGGA	qPCR 检测

各胁迫剂的 V8 培养基上进行观察, 72 h 后测量菌落直径并拍照记录。每个处理做 3 个生物学重复, 测量结果进行单因素方差分析法显著性统计分析。

1.7 致病能力测定 取直径为 5 mm 的 LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62$ -C 菌丝块接种至 5~6 片真叶龄期的辣椒叶片, 以空白琼脂块为对照 (Mock); 黑暗培养 24 h 后移除菌块继续培养 48 h 观察致病情况, 并用 ImageJ 软件统计病斑面积, 每个处理 3 株重复, 并通过单因素方差分析法进行显著性统计分析。

2 结果与分析

2.1 辣椒疫霉发育及侵染阶段 *PcSec62* 的转录水平检测 为确定 *PcSec62* 是否参与调控辣椒疫霉的生长发育及致病性, 提取菌丝、孢子囊和游动孢子及辣椒疫霉侵染辣椒叶片 4 个时间点样本的总 RNA 进行 qRT-PCR 定量分析。结果表明, 在已检

测的辣椒疫霉 3 个发育阶段中, *PcSec62* 在孢子囊中表达量最高, 游动孢子次之, 菌丝体的表达量最低; 而在侵染阶段, 与纯菌丝体相比, *PcSec62* 在侵染 12 和 72 h 的表达量显著上调 (图 1), 该结果表明 *PcSec62* 可能参与调控辣椒疫霉的发育和致病阶段。

2.2 辣椒疫霉 *PcSec62* 基因敲除与回补的鉴定 为研究 *PcSec62* 基因在辣椒疫霉中的功能, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 用 *HPH* 基因对 *PcSec62* 进行同源替换 (图 2-a), 对获得的转化子进行 PCR 验证。结果显示, $\Delta Pcsec62$ 敲除转化子中 *PcSec62* 基因检测无条带, 而 *HPH* 基因检测有条带, 表明 *PcSec62* 基因被 *HPH* 基因成功置换, 证明获得 *PcSec62* 候选完全敲除突变体 (图 2-b)。经测序分析证实 *PcSec62* 基因已成功被 *HPH* 基因替换, 证明获得 $\Delta Pcsec62$ 突变体 (图 2-c)。随后, 对 $\Delta Pcsec62$ 突变体进行 *PcSec62* 基因原位回

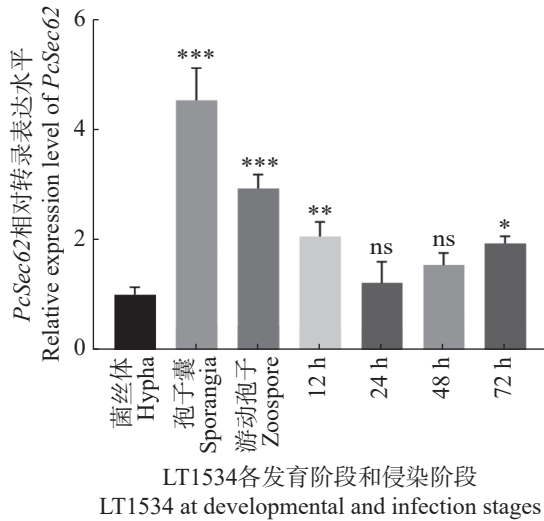


图 1 qRT-PCR 检测辣椒疫霉发育及感染阶段 *PcSec62* 相对转录表达水平

Fig. 1 qRT-PCR detection of the relative mRNA transcript levels of *PcSec62* during the development and infection stages of *P. capsici*.

注: 数据结果采用单因素方差分析均值比较分析 3 个独立重复的差异显著性; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, 不显著。

Note: A one-way ANOVA was conducted to compare the means of three independent groups and to determine whether there is a statistically significant difference between the corresponding population means; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant.

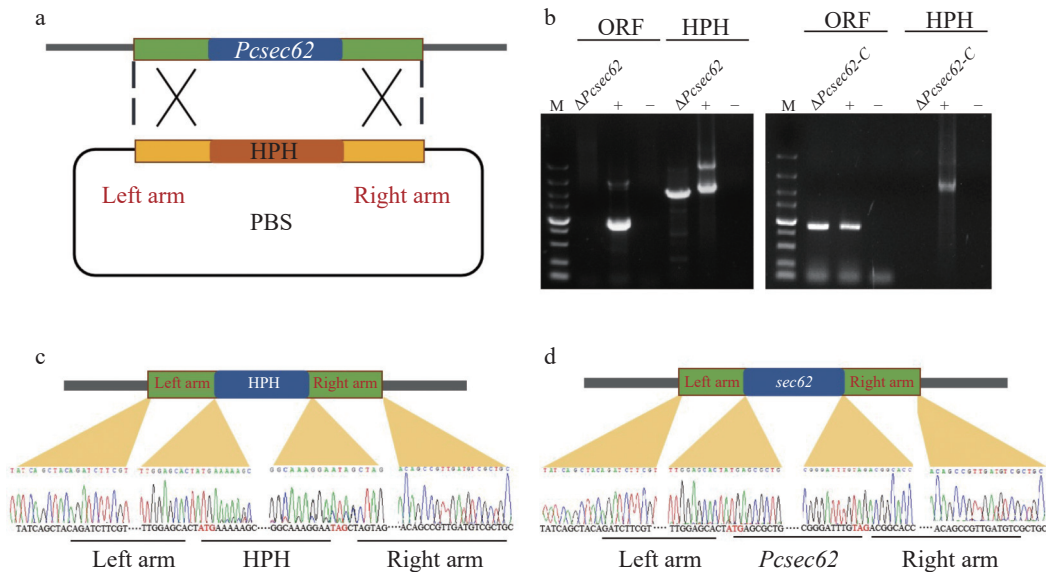


图 2 辣椒疫霉 *PcSec62* 基因敲除及回补验证

Fig. 2 Verification of *PcSec62* gene knockout and complementation in *P. capsici* strains.

注: ORF 检测阳性对照为 LT1534 基因组 DNA; HPH 检测阳性对照为构建完成的 pBS 载体; $\Delta Pcsec62$, *PcSec62* 基因缺失突变体; $\Delta Pcsec62-C$, *PcSec62* 基因缺失突变体的回补菌株; +, 以野生型 LT1534 基因组 DNA 和 pBS 载体为模板扩增 *PcSec62* 和 *HPH* 基因结果为阳性对照; -, 纯水为模板扩增 *PcSec62* 和 *HPH* 基因结果为阴性对照;

Note: The positive control for ORF detection was LT1534 genome DNA, while the positive control for *HPH* detection was the constructed pBS empty vector. In this context, $\Delta Pcsec62$ refers to the *PcSec62* gene deletion mutant; $\Delta Pcsec62-C$ refers to the *PcSec62* gene complementary strain. The symbol '+' indicates the result of amplification of the *PcSec62* and *HPH* gene using wild-type genomic DNA and pBS vector as a positive control; the symbol '-' indicates the result of amplification with water as template for the negative control.

补, $\Delta Pcsec62-C$ 回补转化子中 *HPH* 基因检测无条带, 而 *PcSec62* 基因检测有条带。通过 PCR 检测和测序分析证实获得了原位回补菌株 $\Delta Pcsec62-C$ (图 2-b, d)。

2.3 *PcSec62* 基因敲除影响辣椒疫霉的营养生长和菌丝形态 为明确 *PcSec62* 是否影响辣椒疫霉生长和形态变化, 在 V8 培养基上分别接种 LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 和 $\Delta Pcsec62-C$ 菌株; 每 12 h 测量 1 次直径, 72 h 后拍照记录并统计分析。结果表明, EV 和 LT1534 菌丝生长速率基本相同; 与 LT1534 相比, $\Delta Pcsec62$ 生长速度显著降低, $\Delta Pcsec62-C$ 菌株生长速率恢复到 LT1534 的水平 (图 3-a, b, c), 表明 *PcSec62* 参与调控辣椒疫霉的菌丝生长。进一步对供试菌株菌丝尖端的形态进行观察。结果表明: $\Delta Pcsec62$ 菌丝尖端的菌丝膨大体异常增加 (图 3-c), 通过统计 100 根菌丝体每 200 μm 的菌丝膨大体的数量, 发现 $\Delta Pcsec62$ 突变菌丝尖端膨大体的数量显著高于 LT1534、EV。回补 *PcSec62* 基因后, 菌丝膨大体数量恢复

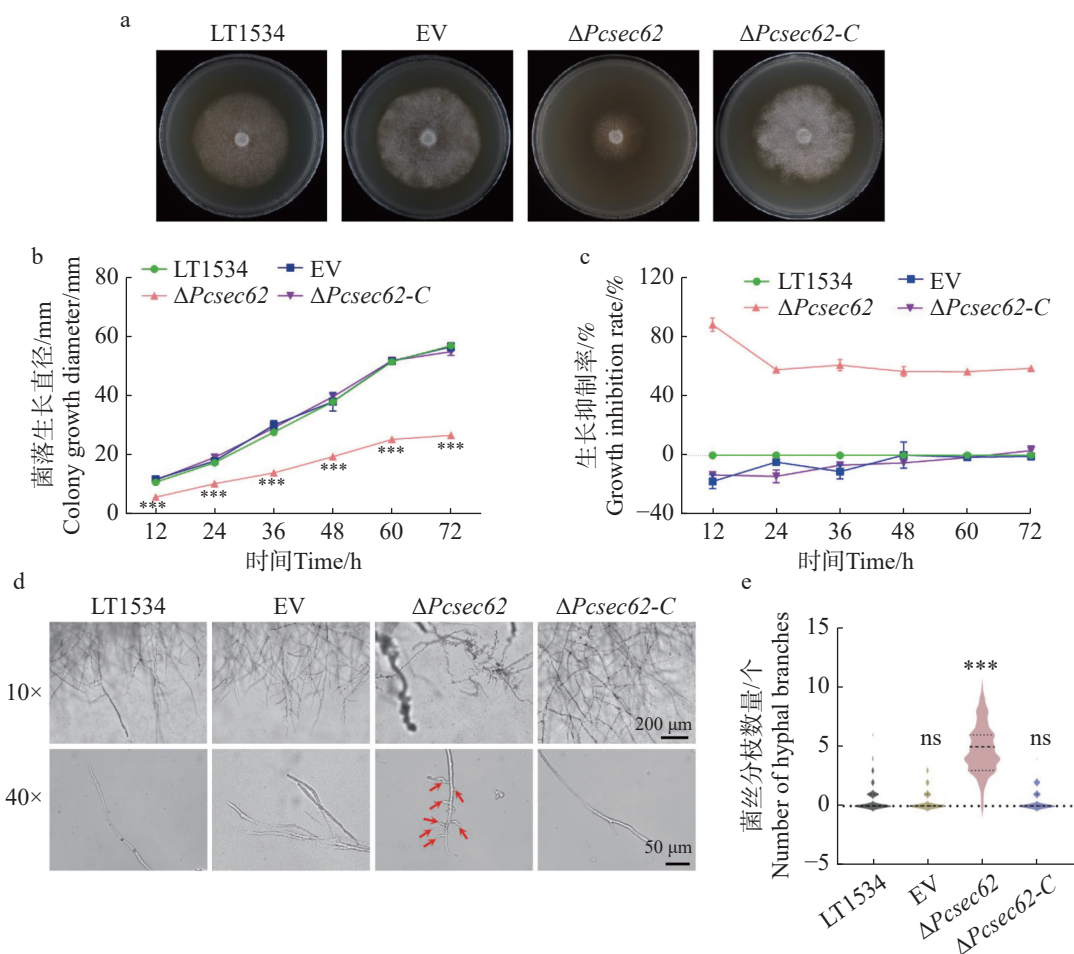


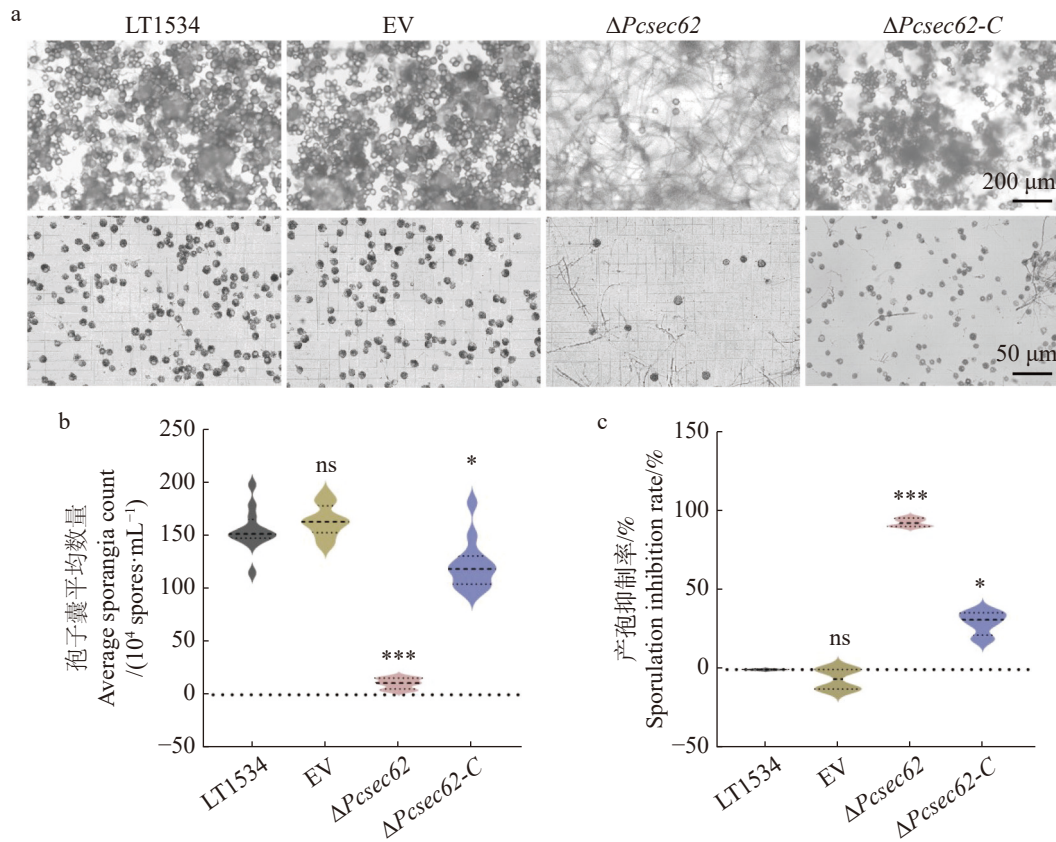
图 3 *PcSec62* 影响辣椒疫霉菌丝生长及菌丝尖端形态
Fig. 3 Effect of $\Delta Pcsec62$ on colony and hyphal morphology of *P. capsici*
 注: 10 \times , 10 倍放大; 40 \times , 40 倍放大, 红色箭头指示菌丝膨大体; 标尺, 200 μm 和 50 μm ; 统计结果用单因素方差法进行差异显著性分析(***, $P < 0.001$; ns, 不显著)。
 Note: 10 \times , 10 times magnification; 40 \times , 40 times magnification. Red arrows, hyphal enlargements; scale bars, 200 μm and 50 μm . Statistical analyses were performed using one-way ANOVA (***, $P < 0.001$; ns, no significant).

至野生型水平(图 3-d)。表明 *PcSec62* 可能通过抑制辣椒疫霉菌丝极性生长, 从而影响菌丝生长速率。

2.4 *PcSec62* 调控辣椒疫霉的无性繁殖 为研究 *PcSec62* 对辣椒疫霉产孢能力的影响, 对 LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62$ -C 菌株进行光照诱导并对孢子囊的数量进行统计。结果显示: LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62$ -C 菌株孢子囊数量分别为 1.552×10^6 、 1.638×10^6 、 1.075×10^5 、 1.225×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 相比于 LT1534 和 EV 菌株, $\Delta Pcsec62$

突变体孢子囊数量显著下降, 而回补菌株 $\Delta Pcsec62$ -C 孢子囊产量恢复到约野生型水平的 80%(图 4-a, b)。结果表明 *PcSec62* 参与调控辣椒疫霉的无性繁殖。

2.5 *PcSec62* 参与辣椒疫霉对非生物胁迫应答 为明确 *PcSec62* 基因在非生物胁迫反应中的作用, 将 LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62$ -C 菌株分别接种至含 NaCl、KCl、SDS、Sorbitol、DTT、CR 胁迫剂的培养基进行观察, 72 h 后测量直径、拍摄照片并计算分析其抑制率(图 5-a)。结果表明, 与



a. LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62-C$ 菌株光照诱导3 d后无性产孢观察，标尺：200 μm 和50 μm ；b-c. LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62-C$ 菌株无性产孢量及抑制率统计分析。

a: The asexual sporulation of the LT1534, EV, $\Delta Pcsec62$, and $\Delta Pcsec62-C$ strains was observed after 3 days of light induction. Scale bars represent 200 μm and 50 μm . b-c: Statistical analysis of asexual sporulation and inhibition rate of LT1534, EV, $\Delta Pcsec62$ and $\Delta Pcsec62-C$ strains was conducted using a one-way ANOVA.

图 4 *PcSec62* 影响辣椒疫霉无性产孢能力

Fig. 4 Impact of $\Delta PcSec62$ on asexual sporulation in *P. capsici*

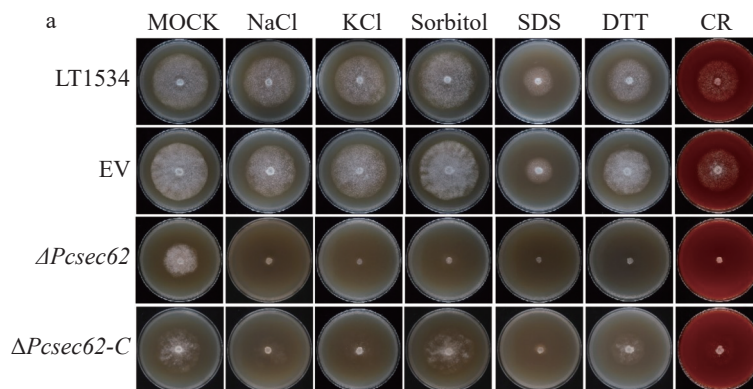
注: ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$; ns, 不显著。

Note: ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$; ns, not significant.

LT1534 相比, $\Delta Pcsec62$ 对各胁迫试剂的耐受性显著降低, 对 $\Delta Pcsec62$ 的抑制率 NaCl 为 71.29%, KCl 为 82.90%, Sorbitol 为 62.97%, SDS 为 100.00%, DTT 为 97.33%, CR 为 81.12%; 回补 *PcSec62* 基因后 $\Delta Pcsec62-C$ 对非生物胁迫耐受能力部分得到恢复(图 5-b), 表明 *PcSec62* 可能参与

辣椒疫霉对非生物胁迫的调控。

2.6 *PcSec62* 调控辣椒疫霉的致病性 为了确定 *PcSec62* 对辣椒疫霉致病性的影响, 以琼脂块作为空白对照, 分别将 LT1534、EV、 $\Delta Pcsec62$ 、 $\Delta Pcsec62-C$ 接种到辣椒叶片表面进行侵染(图 6-a)。结果表明与 LT1534 和 EV 对照相比,



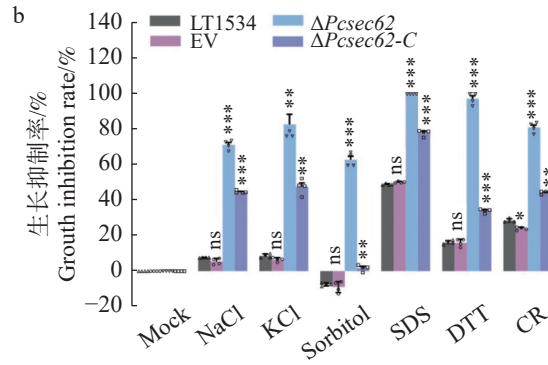


图 5 *PcSec62* 参与辣椒疫霉对不同非生物胁迫的响应
Fig. 5 *PcSec62* is involved in the regulation of abiotic stress tolerance of *P. capsici*
 注: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, 不显著。
 Note: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant.

$\Delta Pcsec62$ 侵染叶片后造成的病斑面积显著变小, 而回补 *PcSec62* 基因后 $\Delta Pcsec62-C$ 致病能力基本恢复至 LT1534 水平(图 6-b)。这表明 *PcSec62* 在调节辣椒疫霉的侵染及致病过程中起着重要作用。

定位于内质网膜, 参与调节内质网应激恢复, 介导内质网中未折叠蛋白以及错误折叠蛋白向溶酶体的运输维持细胞稳态等多种生命过程^[26]。在本研究中, 辣椒疫霉 *PcSec62* 在各生长发育及侵染阶段中菌体与纯菌丝体相比在转录水平上差异显著, 在孢子囊及致病过程中显著上调表达, 这表明 *PcSec62* 对辣椒疫霉生长发育及致病性至关重要

3 讨论

Sec62 是内质网膜易位子复合体的重要成员,

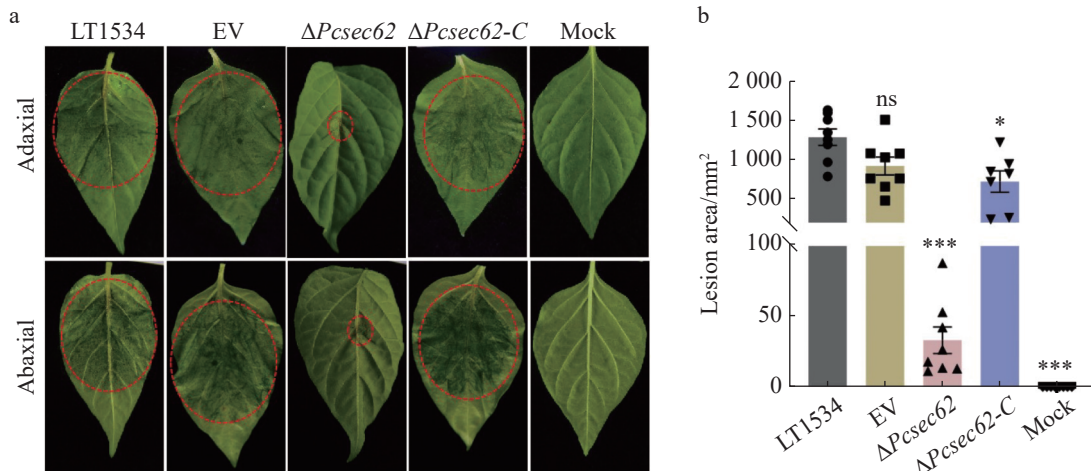


图 6 *PcSec62* 影响辣椒疫霉致病力
Fig. 6 Effect of *PcSec62* on the pathogenicity of *P. capsici*
 注: ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$; ns, no significant。
 Note: ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$; ns, not significant.

a: LT1534, EV, $\Delta Pcsec62$, 和 $\Delta Pcsec62-C$ 菌接种至 5-6 叶龄辣椒叶片进行致病力测定, 以琼脂块为对照, 每个处理 3 株重复, 并用 ImageJ 统计病斑面积, 红色虚线为病斑面积, Adaxial: 正面, Abaxial: 背面; b: 各菌株侵染病斑面积统计分析。

要。在植物中, *AtSec62* 缺失导致拟南芥生长受损, 花粉异常和育性下降^[17-18]; 辣椒疫霉 *PcSec62* 缺失后菌丝生长受到抑制, 产孢能力几乎丧失, 而回补菌株的菌丝生长和产孢表型基本恢复至野生型水平, 这证明辣椒疫霉 *PcSec62* 与 *AtSec62* 功能类似, 对生长及发育至关重要。这可能是由于 *Sec62* 作为易位蛋白复合体组分, 在促进分泌蛋白与膜蛋白的易位和分泌所引起^[27]。有意思的是, *PcSec62* 缺失后菌丝生长受阻, 菌丝膨大体数量显著增加。在丝状真菌中, 菌丝生长是通过菌丝尖端凝集新的质膜, 伴随着分泌囊泡的胞吐作用合成新的细胞壁等组分引起^[28-29]。这可能是 *PcSec62* 的缺失破坏了分泌途径, 间接影响菌丝体尖端的生长, 从而抑制菌丝的营养生长。内质网相关基因 *FgErv14* 和 *MoDer1* 参与真菌的无性繁殖^[30-31], *RTN1* 则可调控有性生殖过程, 表明内质网相关因子对生殖发育至关重要^[32]。本研究中, *PcSec62* 缺失导致辣椒疫霉几乎完全丧失产孢能力, 这可能与 *PcSec62* 缺失破坏易位复合体, 影响生长发育相关蛋白加工所致。本研究 $\Delta Pcsec62$ -C 回补菌株在孢子囊产量及非生物胁迫表型未完全恢复至野生型水平。这可能是辣椒疫霉为二倍体而 $\Delta Pcsec62$ -C 回补未获得纯合互补菌株导致的干扰现象。

Sec62 是重要的内质网应激调节因子, 参与内质网的应激恢复^[16]。本研究发现, *PcSec62* 的缺失使辣椒疫霉对钠盐、钾离子、细胞壁、细胞膜等非生物胁迫更敏感, 但回补后敏感性得到部分缓解。尽管本研究结果尚未阐明 *PcSec62* 对非生物胁迫的调控机制, 但可以证实 *PcSec62* 在辣椒疫霉对环境胁迫中起着重要作用。此外, *PcSec62* 的缺失导致辣椒疫霉的致病性几乎完全丧失, 这可能是 *PcSec62* 直接影响辣椒疫霉生长及产孢等表型, 也可能 *Sec62* 的缺失破坏内质网易位系统及分泌系统, 从而影响大量致病相关效应蛋白合成或分泌受阻, 间接导致辣椒疫霉致病力下降^[33-35]。

4 结 论

本研究通过对 *PcSec62* 在辣椒疫霉生长发育及侵染阶段的转录表达及生长、产孢和致病性生物学功能分析, 证实 *PcSec62* 参与调控辣椒疫霉的生长发育、胁迫应答及致病性。本研究结果对阐

明内质网途径介导的致病机制具有重要意义, 但具体机制仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] QUESADA-OCAMPO L M, PARADA-ROJAS C H, HANSEN Z, et al. *Phytophthora capsici*: Recent progress on fundamental biology and disease management 100 years after its description [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2023, 61: 185–208. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754>
- [2] LAMOUR K H, STAM R, JUPE J, et al. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- [3] WANG W Y, LIU X, HAN T, et al. Differential potential of *Phytophthora capsici* resistance mechanisms to the fungicide Metalaxyl in peppers [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 278. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020278>
- [4] 李惠霞, 刘永刚, 漆永红. 12 种杀菌剂对辣椒疫霉菌的室内毒力比较 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2006, 41(5): 63–66. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-4315.2006.05.015>
- [5] LI Z Z, VELÁSQUEZ-ZAPATA V, ELMORE J M, et al. Powdery mildew effectors AVR_{A1} and BEC1016 target the ER J-domain protein *HvERdj3B* required for immunity in barley [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2024, 25(5): e13463. <https://doi.org/10.1111/mpp.13463>
- [6] GOH J, JEON J, LEE Y H. ER retention receptor, *Mo-ERR1* is required for fungal development and pathogenicity in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1259. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01237-x>
- [7] YI M, CHI M H, KHANG C H, et al. The ER chaperone LHS1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(2): 681–695. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055988>
- [8] MÜLLER L, DE ESCAURIAZA M D, LAJOIE P, et al. Evolutionary gain of function for the ER membrane protein *Sec62* from yeast to humans [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(5): 691–703. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-08-0730>
- [9] AGARRABERES F A, DICE J F. Protein translocation across membranes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2001, 1513(1): 1–24. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(01\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(01)00005-3)
- [10] MEYER H A, GRAU H, KRAFT R, et al. Mammalian *Sec61* is associated with *Sec62* and *Sec63* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(19): 14550–14557. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14550>
- [11] LINXWEILER M, SCHORR S, SCHÄUBLE N, et al.

- Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of *SEC62* gene silencing in human tumor cells [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 574. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-574>
- [12] LANG S, BENEDIX J, FEDELES S V, et al. Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells [J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(8): 1958–1969. <https://doi.org/10.1242/jcs.096727>
- [13] LAKKARAJU A K K, THANKAPPAN R, MARY C, et al. Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23(14): 2712–2722. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-03-0228>
- [14] ITSKANOV S, KUO K M, GUMBART J C, et al. Step-wise gating of the Sec61 protein-conducting channel by Sec63 and Sec62 [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2021, 28(2): 162–172. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00541-x>
- [15] LINXWEILER M, SCHICK B, ZIMMERMANN R. Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2017, 2(1): 17002. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.2>
- [16] FUMAGALLI F, NOACK J, BERGMANN T J, et al. Corrigendum: Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery [J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(1): 76. <https://doi.org/10.1038/ncb3451>
- [17] HU S, YE H, CUI Y, et al. *AtSec62* is critical for plant development and is involved in ER-phagy in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(2): 181–200. <https://doi.org/10.1111/jipb.12872>
- [18] MITTERREITER M J, BOSCH F A, BRYLOK T, et al. The ER luminal C-terminus of *AtSec62* is critical for male fertility and plant growth in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2020, 101(1): 5–17. <https://doi.org/10.1111/tpj.14483>
- [19] ZHOU Z Z, PANG Z Q, LI G H, et al. Endoplasmic reticulum membrane-bound *MoSec62* is involved in the suppression of rice immunity and is essential for the pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(8): 1211–1222. <https://doi.org/10.1111/mpp.12357>
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [21] WANG Z W, TYLER B M, LIU X L. Protocol of *Phytophthora capsici* transformation using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1848: 265–274. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8724-5_17
- [22] QIU M, LI Y N, YE W W, et al. A CRISPR/Cas9-mediated in situ complementation method for *Phytophthora sojae* mutants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(3): 373–381. <https://doi.org/10.1111/mpp.13028>
- [23] 鲁婧文, 关小灵, 李潇, 等. *CsSSK1* 基因调控暹罗炭疽菌胁迫应答和致病性的功能分析 [J]. *热带作物学报*, 2024, 45(3): 622–631. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2024.03.020>
- [24] YU G, LI W Q, YANG C D, et al. *Platg8*-mediated autophagy regulates vegetative growth, sporangial cleavage, and pathogenesis in *Peronophythora litchii* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(1): e0353123. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03531-23>
- [25] LV L, YANG C D, ZHANG X, et al. Autophagy-related protein *PLATG2* regulates the vegetative growth, sporangial cleavage, autophagosome formation, and pathogenicity of *Peronophythora litchii* [J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2322183. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2322183>
- [26] SU S, SHI Y T, CHU Y, et al. Sec62 promotes gastric cancer metastasis through mediating UPR-induced autophagy activation [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(2): 133. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04143-2>
- [27] RIQUELME M, AGUIRRE J, BARTNICKI-GARCÍA S, et al. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2018, 82(2): e00068–17. <https://doi.org/10.1128/mmr.00068-17>
- [28] ZHENG P, NGUYEN T A, WONG J Y, et al. Spitzenkörper assembly mechanisms reveal conserved features of fungal and metazoan polarity scaffolds [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2830. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16712-9>
- [29] RIQUELME M, REYNAGA-PEÑA C G, GIERZ G, et al. What determines growth direction in fungal hyphae? [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 1998, 24(1/2): 101–109. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1074>
- [30] SUN F J, LV B B, ZHANG X M, et al. The endoplasmic reticulum cargo receptor *FgErv14* regulates DON production, growth and virulence in *Fusarium graminearum* [J]. *Life*, 2022, 12(6): 799. <https://doi.org/10.3390/life12060799>
- [31] TANG W, JIANG H L, ARON O, et al. Endoplasmic reticulum-associated degradation mediated by MoHrd1 and MoDer1 is pivotal for appressorium development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(12): 4953–4973. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15069>
- [32] DE JESÚS LÓPEZ-FUENTES A, NACHÓN-

- GARDUÑO K N, SUASTE-OLMOS F, et al. Spindle dynamics during meiotic development of the fungus *Podospira Anserina* requires the endoplasmic reticulum-shaping protein RTN1 [J]. *mBio*, 2021, 12(5): e0161521. <https://doi.org/10.1128/mbio.01615-21>
- [33] QIAN B, SU X T, YE Z Y, et al. MoErv29 promotes apoplastic effector secretion contributing to virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *New Phytologist*, 2022, 233(3): 1289–1302. <https://doi.org/10.1111/nph.17851>
- [34] MEI J, LI Z Q, ZHOU S Q, et al. Effector secretion and stability in the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* requires N-linked protein glycosylation and the ER chaperone pathway [J]. *New Phytologist*, 2023, 240(4): 1449–1466. <https://doi.org/10.1111/nph.19213>
- [35] ALONSO A P M, ALI S, SONG X, et al. UhAVR1, an HR-triggering avirulence effector of *Ustilago hordei*, is secreted via the ER-Golgi pathway, localizes to the cytosol of barley cells during *in planta*-expression, and contributes to virulence early in infection [J]. *Journal of Fungi*, 2020, 6(3): 178. <https://doi.org/10.3390/jof6030178>

PcSec62* is involved in regulating the growth, development and virulence of *Phytophthora capsici

Huang Yuyuan[#], Ye Qianqian, Chen Qinghe*, Liang Qifu*

(Sanya Nanfan Institute/School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: The endoplasmic reticulum (ER) serves as a crucial site for protein processing in eukaryotic cells. Sec62, an essential component of the ER translocation complex, plays a significant role in growth, development, and stress regulation. An attempt was made to examine the transcription levels of the *PcSec62* gene at various growth stages and during pathogenic processes. The *PcSec62* gene was knocked out by using CRISPR/Cas9 gene editing to produce knockout mutants ($\Delta Pcsec62$) and a complementary strain ($\Delta Pcsec62$ -C). The results showed that the transcriptional expression of *PcSec62* significantly increased during the sporangia and infection stages. The $\Delta Pcsec62$ mutants exhibited notably reduced growth and sporulation abilities, alongside stunted hyphal growth. Additionally, the $\Delta Pcsec62$ strain showed significantly low tolerance to abiotic stress and reduced pathogenicity. These findings indicate that *PcSec62* is involved in regulating the growth, development, abiotic stress responses, and pathogenicity of *Phytophthora capsici*.

Keywords: *Phytophthora capsici*; *PcSec62*; endoplasmic reticulum stress; growth and development; virulence

(责任编辑:叶 静)