



植物相关细菌中VI型分泌系统的功能研究进展

王晶瑶, 尹芮, 杨建社, 成娟丽, 林金水*

延安大学生命科学学院 陕西省红枣重点实验室, 陕西 延安 716000

王晶瑶, 尹芮, 杨建社, 成娟丽, 林金水. 植物相关细菌中VI型分泌系统的功能研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2573-2594.

WANG Jingyao, YIN Rui, YANG Jianshe, CHENG Juanli, LIN Jinshui. Research progress in the function of type VI secretion system in plant-associated bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2573-2594.

摘要: VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)是一种强大的细菌分子武器, 它通过将效应蛋白注入原核或真核细胞而介导细菌间竞争并影响宿主的生命活动。T6SS 广泛分布于革兰氏阴性菌中, 主要存在于变形菌门(*Proteobacteria*)。尽管 T6SS 的研究大多集中在动物相关细菌上, 但它在植物相关细菌中的作用不能被忽视。本文对植物相关细菌的 T6SS 进行了较为详细的介绍, 主要从 T6SS 的发现、T6SS 在植物相关细菌间竞争中的作用、在细菌与植物互作中的作用以及在植物生物防治中的作用等 4 个方面综述了最新的研究成果, 旨在为今后更好地研究植物相关细菌 T6SS 的生物学功能及其应用提供指导。

关键词: VI型分泌系统(T6SS); 植物相关细菌; 功能; 效应蛋白; 生物防治

资助项目: 国家自然科学基金(32070103, 31860012); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2021JM-415); 陕西省“特支计划”区域发展人才项目; 陕西省普通高等学校青年杰出人才支持计划项目; 陕西高校青年创新团队(2022)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070103, 31860012), the Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (2021JM-415), the Regional Development Talent Project of the “Special Support Plan” of Shaanxi Province, the Grant from the Outstanding Young Talent Support Plan of the Higher Education Institutions of Shaanxi Province, and the Youth Innovation Team of Shaanxi Universities (2022).

*Corresponding author. Tel: +86-911-2332030, E-mail: linjinshui@yau.edu.cn

Received: 2022-10-31; Accepted: 2023-01-01; Published online: 2023-01-05

Research progress in the function of type VI secretion system in plant-associated bacteria

WANG Jingyao, YIN Rui, YANG Jianshe, CHENG Juanli, LIN Jinshui*

Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube, School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: The type VI secretion system (T6SS), a powerful tool of bacteria, is involved in inter-bacterial competition and affects host life activities by injecting effector proteins into prokaryotic or eukaryotic cells. T6SS is ubiquitous in Gram-negative bacteria, mainly existing in *Proteobacteria*. Although most studies of T6SS have focused on animal bacteria, its role in plant-associated bacteria cannot be ignored. We introduced the T6SS of plant-associated bacteria in detail and summarized the latest research achievements from four aspects: the discovery of T6SS, the role of T6SS in the competition among plant-associated bacteria, the role of T6SS in the interactions between bacteria and plants, and the role of T6SS in the biocontrol of plant diseases. This review aims to provide guidance for the future research on the biological functions and applications of T6SS in plant-associated bacteria.

Keywords: type VI secretion system (T6SS); plant-associated bacteria; function; effector; biocontrol

细菌与宿主以及环境中的其他细菌之间存在密切联系^[1]。细菌与其他生物之间的相互作用使得细菌能够更好地生存和适应环境,同时保护自身不受外界不良影响和免疫环境的攻击^[2-3]。通常,细菌可以进化出多种机制以增强自身对宿主的侵染能力以及促进自身与周围环境的交流,利用分泌系统传递效应蛋白被认为是细菌间交流和适应环境最有效的策略之一^[3-4]。目前为止,细菌中已经发现9种分泌系统,分别为I型分泌系统到IX型分泌系统(T1SS-T9SS),它们是细菌在长期的进化过程中形成的一种与外界环境进行相互作用的工具^[5-11]。这些分泌系统存在于不同类型的细菌中,各自独立,各个分泌系统所分泌蛋白的种类和方式以及生物学功能也各不相同^[12]。其中VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)被认为是一种接触性毒

素投递装置,拥有复杂多样的生物学功能,因而受到广泛的关注^[13-14],其主要功能包括:(1)介导细菌间的竞争^[15];(2)调控细菌生物被膜的形成^[16];(3)抗真核细胞^[17];(4)介导细菌对金属离子的摄取^[18-19]。

T6SS不仅具有多样化的生物学功能,其结构也十分复杂。T6SS在结构上与噬菌体相似,由13个不同的结构成分组成,其主要结构分为3部分:基座复合体(baseplate, BP)、跨膜复合体(membrane complex, MC)以及管状结构^[20-23]。如图1所示,基座复合体是T6SS组装的基础,呈楔形,由TssE-TssF-TssG-TssK组成^[24-26]。内膜上的TssM-TssL蛋白复合物与固定在外膜上的脂蛋白TssJ结合形成跨膜复合体^[27]。在大多数细菌T6SS中,TssL具有一个额外的肽聚糖结合结构域。而不含该结构域的细菌往往会利

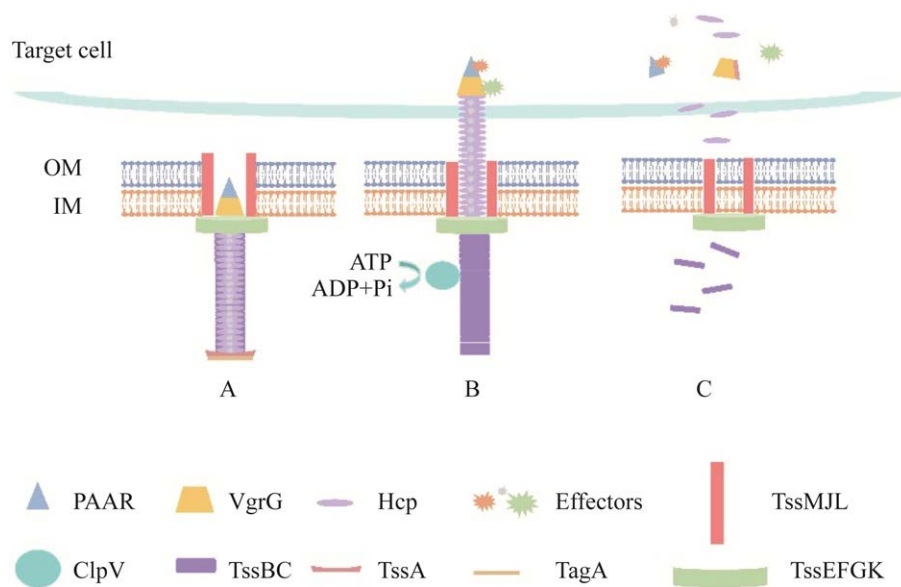


图 1 T6SS 的组装及分泌示意图

Figure 1 Schematic diagram of assembly and secretion of T6SS. A: The T6SS is activated and assembled. B: T6SS is assembled and effectors are secreted. C: After secretion, the sheath of TssB-TssC was depolymerized and T6SS was deassembled.

用附加的膜蛋白 TagL 来代替 TssL 的肽聚糖结合结构域, 与 TssL 相互作用, 帮助跨膜复合体锚定在肽聚糖层上, 因此有时也将 TagL 作为 T6SS 跨膜复合体的一部分^[28]。跨膜复合体横跨细菌细胞内膜和外膜, 既可以作为效应蛋白转运的通道又可以将管状结构固定在细胞膜上^[29]。管状结构包括 Hcp 内管、TssB-TssC 外鞘和位于鞘管顶端的 VgrG-PAAR 针尖复合体^[30]。在 T6SS 的组装过程中基座复合体和跨膜复合体将 T6SS 固定在细胞膜上, Hcp 蛋白在外鞘中不断堆叠形成内管结构并开始延伸, 当延伸的管状结构遇到位于细胞另一侧内膜上的 TagA 蛋白时, 其延伸则被终止^[23,31]。之后 TssB-TssC 复合物收缩将 Hcp 管、顶端的 VgrG-PAAR 以及携带的效应蛋白一并推送到靶细胞, 从而完成效应蛋白的分泌^[32-33]。T6SS 完成对效应蛋白的分泌后会处于一种收缩的状态, 在这种收缩状态下 AAA+ATP 酶 ClpV 依赖 TagJ 与 TssC N

端的 ClpV 识别位点结合并水解 ATP, TssB-TssC 外鞘利用水解 ATP 产生的能量解聚并回收, 以便另一个 T6SS 组装时使用^[34-35]。基座复合体、跨膜复合体和 TagA 继续保留, 而其他用于 T6SS 组装的蛋白如 Hcp、TagJ 和 ClpV 等被水解, 以用于下一次组装^[23,36]。

细菌 T6SS 的功能主要是由其分泌蛋白的功能所决定, T6SS 分泌的蛋白包括具有运载能力的结构蛋白和具有生物学活性的效应蛋白^[37]。这些蛋白通常可以靶向真核或是原核细胞并发挥功能, 从而在微生物-微生物以及微生物-宿主相互作用中为细菌提供生存优势^[38-40]。依赖 T6SS 分泌的效应蛋白可根据结构分为 2 大类, 第一类为带有延伸效应结构域的分秘性结构蛋白。这些蛋白既可以作为 T6SS 的重要结构组成部分, 也可以将延伸的效应功能域分泌到靶细胞而发挥特异的生物学效应^[37]。第二类效应蛋白为非结构性分泌蛋白, 又被称为专属效应

蛋白(dedicated effector)^[37]。专属效应蛋白主要是以非共价的方式锚定在 Hcp、VgrG 或 PAAR 等分泌性结构蛋白上并随之一起分泌^[41-43]。除此之外,部分专属效应蛋白并不能直接与 PAAR、Hcp 或 VgrG 等分泌性结构蛋白非共价结合,而需要特定的接头蛋白介导^[44],通过接头蛋白间接地锚定在分泌性结构蛋白上并随之一起分泌^[41,45]。

目前发现约 25%已测序的革兰氏阴性菌基因组中编码 T6SS,其中包括大量的植物相关细菌^[40,46]。在细菌与植物共同进化的过程中,大多数细菌与植物之间处于共生状态,对植物没有明显的有益或有害影响^[47]。尽管植物相关细菌中只有少部分菌株会引起植物病害,但这一小部分菌株所引起的病害会对农作物产生巨大的负面影响而造成严重的经济损失^[48]。到目前为止植物病原细菌对植物的致病机制尚不完全清楚,但已有研究表明 T6SS 可能是植物病原细菌损害植物体的主要装置之一^[49]。由于植物病原细菌对人类资源存在巨大威胁,因此在植物中病原细菌得到了广泛的关注,T6SS 在植物相关细菌中的研究也主要集中于此^[35,50-52]。除植物病原细菌外,T6SS 也存在于许多与植物共生的细菌中,这些植物共生细菌分布于植物的多个部位^[53-56]。本文通过列举一些典型植物相关细菌的例子对植物病原细菌以及非病原细菌中 T6SS 的功能进行了阐述,旨在为今后更好地研究植物相关细菌 T6SS 的生物学功能及其应用提供指导。

1 T6SS 的发现

T6SS 最初是在植物相关的豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)中发现且研究的^[57]。根瘤菌属的细菌可以与豆科植物在特殊发育的器官——根瘤中建立共生关系,为植物提供固

定的氮^[58-59]。豌豆根瘤菌 RBL5523 含有一种编码豆类根瘤菌结瘤因子的质粒,该质粒使 RBL5523 诱导豌豆植株进行适度结瘤,但形成的根瘤缺少固氮能力^[57]。在根瘤菌 RBL5523 中,使用 Tn5 转座子进行插入突变。当 T6SS 关键基因 *impJ* 被 Tn5 转座子插入突变后得到的突变株能使豌豆形成更多的根瘤并能有效固氮^[57]。当用 RBL5523 野生型菌株的培养物上清液培养 *impJ* 突变株时,*impJ* 突变株表型恢复到野生型水平,即根瘤数量以及固氮作用明显减少^[57]。而换用 *impJ* 突变株培养物上清液则不会出现这种现象^[57]。另外,当野生型菌株与 *impJ* 突变株共同侵染豌豆时,在所形成的根瘤中仅能检测到 *impJ* 突变株^[57]。这种现象表明豌豆根瘤菌 T6SS 分泌到胞外的效应蛋白会对豌豆结瘤和固氮的表型产生一定的抑制效果^[57]。同时这种现象也说明根瘤菌 RBL5523 的 T6SS 效应蛋白可以只分泌到培养物上清液中,而不需要直接转位到靶细胞中便可以产生效果^[47]。

那么其他细菌 T6SS 的分泌底物是否也存在仅分泌到细胞外便可发挥生物学功能的现象呢?铜绿假单胞菌 H3-T6SS 分泌底物 TseF 可以与自身分泌的铁螯合剂 2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS)结合,与 PQS-Fe³⁺结合的 TseF 随 PQS-Fe³⁺一同定位于外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)上,并且帮助 OMV 上的 PQS-Fe³⁺通过外膜受体蛋白 FptA 或 OprF 转运进入细胞,完成对胞外 Fe³⁺的摄取^[18]。在台湾假单胞菌中也发现了类似的情况,台湾假单胞菌以依赖 T6SS 的方式分泌铁载体脓青素(pyoverdine),该铁载体同样不直接转位到靶细胞中便可发挥功能^[60]。另外,假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、泰国伯克霍尔德里氏菌(*Burkholderia thailandensis*)和铜绿假单胞菌的 T6SS 还以类似的方式介导

锌、锰、铜、钼酸盐的获取^[19,61-63]。因此,在多种细菌中都存在 T6SS 的分泌底物不需要直接注射到靶细胞中,而是分泌到细胞外便可以发挥功能的现象,并且这种现象大多发生在细菌对金属离子摄取的过程中。

尽管首次对 T6SS 进行研究并发现 T6SS 的编码基因是在植物相关的豌豆根瘤菌中^[57],但是 T6SS 这个术语最初是由 Pukatzki 等在发现霍乱弧菌 T6SS 时命名的^[64-65]。同时,与动物相关细菌相比,植物相关细菌中 T6SS 的研究很长时间内未受到足够重视,直至近年来才逐步引起关注。

2 T6SS 在植物相关细菌间竞争中的作用

T6SS 在细菌间竞争中发挥着重要的作用,大多数拥有 T6SS 的植物相关细菌在与其他细菌共同存在时都具有较强的生存能力^[47]。通过对植物相关细菌 T6SS 的研究发现,这种竞争优势是植物相关细菌通过 T6SS 向竞争对手细菌转位毒性效应蛋白,抑制竞争对手细菌的生长或直接将其杀死而实现的(表 1)。然而,细菌

毒性效应蛋白在发挥作用时不具有选择性,也会对自身细胞产生毒性。因此,细菌在合成毒性效应蛋白的同时,也会合成与效应蛋白相对应的起解毒作用的免疫蛋白以实现自我保护^[70-71]。

2.1 病原细菌

根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种土壤细菌,可通过 IV 型分泌系统(type IV secretory system, T4SS)将 T-DNA 从细菌细胞转运到植物宿主细胞中,从而触发植物肿瘤的发生^[72]。2014 年, Ma 等首次在根癌土壤杆菌菌株 C58 中描述了一种靶向核酸的 T6SS 效应蛋白^[66]。该效应蛋白是一种属于 Tde 家族的 DNA 酶,依赖 VgrG 而分泌,并且具有毒杀其他细菌的能力^[66]。研究表明,根癌土壤杆菌中 Tde 家族的 2 个效应蛋白 Tde1、Tde2 均可表现出对大肠杆菌的毒性^[66],且它们对大肠杆菌的毒杀作用在碳饥饿的条件下更为显著^[15]。其中, Tde1 含有一个保守的 HxxD 序列,显示出核糖核酸酶活性^[15],但事实上 Tde1 无论在体外还是在大肠杆菌中异源表达都表现出具有降解 DNA 而非降解 RNA 的能力^[66]。另外,根癌土壤杆菌在与其他细菌竞争时, Tde1/Tde2 为根癌土壤杆菌

表 1 介导植物相关细菌间竞争的相关 T6SS 效应蛋白

Table 1 Related T6SS effectors mediating competition among plant-associated bacteria

Strain	Effector	Target site/Function	Activity	References
<i>A. tumefaciens</i> C58	Tde1 Tde2	Target nucleic acid	Nuclease	[66]
<i>P. protegens</i> Pf-5	RhsA	Target nucleic acid	Nuclease	[67]
<i>P. putida</i> KT2440	Tke2* Tke4*	Target nucleic acid	Nuclease	[49]
<i>P. fluorescens</i> F113	Tfe2* Tfe3*	Target nucleic acid	Nuclease	[68]
<i>A. tumefaciens</i> C58	Tae	Target cell wall	Amidase	[66]
<i>P. fluorescens</i> F113	Tfe1*	Target cell wall	Amidase	[68]
<i>P. protegens</i> Pf-5	Tge2 Tge3	Target cell wall	Peptidoglycan glycoside hydrolase	[69]
<i>P. fluorescens</i> F113	Tfe4*	Target cell membrane	Lipase	[68]
<i>P. protegens</i> Pf-5	Tne2	Affect metabolic processes	NAD(P) ⁺ hydrolase	[67]
<i>P. putida</i> KT2440	Tke1*	Affect metabolic processes	NAD(P) ⁺ hydrolase	[49]

*: Represents hypothetical effectors.

提供的竞争优势与细菌所处环境有关^[66]。当根癌土壤杆菌在植物体内与铜绿假单胞菌共培养时，根癌土壤杆菌通过 Tde1/Tde2 攻击铜绿假单胞菌，此时根癌土壤杆菌比铜绿假单胞菌更有效地依赖 T6SS 获得生长优势^[66]。在体外则正好相反，铜绿假单胞菌表现出较根癌土壤杆菌更好的生长趋势^[66]。除此之外，在根癌土壤杆菌菌株 C58 中还存在着具有酰胺酶活性且作用于细菌细胞壁的 T6SS 效应蛋白 Tae，该蛋白可以通过靶向并水解肽聚糖而改变细菌细胞壁的完整性^[66]。细菌细胞壁在维持细菌细胞形态、抵御外源裂解酶侵害以及抵抗细菌内部渗透压等方面具有重要的作用^[36]。细菌细胞壁一旦受到破坏，细菌将不能正常生长甚至死亡^[36]。在根癌土壤杆菌与大肠杆菌竞争过程中 Tae 被转位到大肠杆菌细胞中，靶向细胞壁并裂解肽聚糖中 D-丙氨酸-双胺基脂肪酸(*mDAP*)和 D-谷氨酸之间的化学键，从而破坏大肠杆菌细胞壁的完整性并抑制其生长^[15]，但这种生长抑制作用只在大肠杆菌生长活跃的条件下才有效^[15]。综上所述可知，当根癌土壤杆菌处于不同的生长环境时，存在不同的效应蛋白发挥效应为其提供生长优势。当培养环境含有充足碳源时，效应蛋白 Tae 发挥功能抑制竞争对手细菌的生长，而效应蛋白 Tde 为根癌土壤杆菌提供的生长优势则在碳饥饿的情况下更为显著。因此，T6SS 效应蛋白 Tae 与 Tde 的联合可以在不断变化的环境下为根癌土壤杆菌提供更强的竞争力。

另外，在其他植物病原细菌中也广泛存在着 T6SS，例如瘤块副伯克霍尔氏菌(*Paraburkholderia phymatum*)、水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)和胡萝卜软腐坚固杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)等^[13,73-75]。尽管在这些细菌中尚未鉴定出与细菌间竞争有关的效应蛋白，但是表型分析足以说明 T6SS 在这些

植物病原细菌的细菌间竞争中发挥重要的作用，是病原细菌获得竞争优势的主要原因^[13]。

2.2 非病原细菌

在非致病性的植物相关细菌如保护假单胞菌(*Pseudomonas protegens*)、恶臭假单胞菌以及荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等植物共生细菌中也存在着 T6SS，该分泌系统是这些植物非病原细菌在细菌竞争过程中拥有较强竞争力的主要原因^[49,67-68]。研究表明保护假单胞菌菌株 Pf-5 中存在作用于细胞壁，具有肽聚糖糖苷水解酶活性的 Tge 家族 T6SS 效应蛋白，包括 Tge2 和 Tge3^[69]。其中 Tge2 是一种靶向周质空间的毒性效应蛋白，当 Tge2 在周质空间表达时可对大肠杆菌产生毒性作用，使大肠杆菌活力和数量显著下降^[69]。另外，当保护假单胞菌与恶臭假单胞菌竞争时，缺失 *tge2* 的突变株与野生型相比竞争适应度降低了 6 倍，而缺失功能性 T6SS 的突变株的竞争适应度则降低了 1 000 倍^[69]。这一结果暗示在保护假单胞菌中并非只存在 Tge2 一种效应蛋白对细菌间竞争产生影响。之后的一项研究便解释了这一现象，该研究鉴定了保护假单胞菌中以前尚未描述过的 T6SS 效应蛋白：具有 DNA 酶活性的 RhsA 和具有 NAD(P)⁺水解酶活性的 Tne2^[67]。当保护假单胞菌与恶臭假单胞菌或是与大肠杆菌共培养时，RhsA 和 Tne2 这 2 种效应蛋白均帮助保护假单胞菌在细菌间竞争中获得优势，且这种竞争优势均由这 2 种效应蛋白的 C 末端所介导^[67]。然而，当 RhsA 和 Tne2 均缺失时恶臭假单胞菌的竞争指数远低于只缺失其中一个效应蛋白的情况，因此推测 RhsA 和 Tne2 这 2 种效应蛋白在功能上可能存在协同性^[67]。这一现象可能由 RhsA 产生的 DNA 损伤效果在修复过程中需要依赖 NAD⁺的 DNA 连接酶所引起的，也可能是由同时缺失 RhsA 和 Tne2 时对其他效应蛋白的

分泌产生一定的抑制作用而实现的^[67]。

除此之外, 通过生物信息学分析在恶臭假单胞菌菌株 KT2440 以及荧光假单胞菌菌株 F113 中揭示了多种假定的 T6SS 效应蛋白^[49,68], 包括靶向细胞壁降解肽聚糖的酰胺酶、靶向细胞膜水解脂质的脂肪酶、NAD(P)⁺水解酶以及 4 个结构类似的核酸酶^[49,68]等。其中, 恶臭假单胞菌中 Tke2 蛋白已经被证实是一种属于 HNH 核酸酶超家族且具有核酸酶活性的 T6SS 效应蛋白, 该蛋白依赖于 K1-T6SS 分泌且在大肠杆菌中异源表达时对大肠杆菌生长存在明显的抑制作用^[49]。同时, 恶臭假单胞菌 KT2440 能以依赖 T6SS 的方式在竞争中击溃野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)等植物病原细菌, 并且这种对植物病原细菌的抑制不仅在体外被观察到, 在植物体内也是如此, 但这种现象是否依赖于上述所鉴定的几种效应蛋白有待进一步验证^[49]。

综上所述, 许多植物相关细菌中含有 T6SS, 这些细菌可以依赖 T6SS 分泌毒性效应蛋白并且在与其他细菌竞争过程中获得竞争力, 进而使自身在复杂的细菌环境中获取足够的生长优势。对植物而言, T6SS 为植物相关细菌提供的竞争优势具有两面性。当植物病原细菌中存在 T6SS 时, T6SS 所提供的竞争优势可能对植物促生菌产生抑制, 进而对植物生长产生抑制; 而当植物非病原细菌依赖 T6SS 分泌毒性效应蛋白击败植物病原细菌时, T6SS 提供的竞争优势则反过来对植物产生保护作用。

3 T6SS 对细菌与植物间相互作用的影响

许多植物病原细菌的毒力由 III 型分泌系统(type III secretory system, T3SS)所介导, T3SS

可以直接将效应蛋白转位到植物宿主细胞中并发挥作用^[76]。虽然目前无证据显示 T6SS 的效应蛋白会直接被转位到植物细胞中, 但已有许多研究表明 T6SS 对细菌与植物间的相互作用具有重要的影响(表 2)^[51-52]。

3.1 T6SS 影响植物相关细菌毒力

在引起水稻穗枯病、纹枯病以及幼苗腐烂病的植物病原细菌荚壳伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia glumae*)菌株 BGR1 中含有 4 个 T6SS 基因簇(T6SS group_1、T6SS group_2、T6SS group_4 和 T6SS group_5), 其中 T6SS group_4 和 T6SS group_5 作用于真核宿主^[77]。当用 T6SS group_4 和 T6SS group_5 的单独突变或共同突变菌株侵染生殖生长期的水稻植株时, 感染突变株的水稻比感染野生菌的水稻表现出更好的生长状态。说明在荚壳伯克霍尔德氏菌 BGR1 中 T6SS group_4 和 T6SS group_5 作为靶向真核细胞的系统介导该细菌的毒力, 并且对该细菌毒力起到促进作用^[77]。当用上述几种突变株侵染营养生长期的水稻植株时, 相比野生菌, 受突变株侵染的植株表现出更弱的病症, 这与水稻生殖生长期的毒力测定结果相一致^[77], 这说明 BGR1 中 T6SS group_4 和 T6SS group_5 所介导的该菌对水稻的毒性不受水稻生长时期的影响^[77]。另外, T6SS group_5 基因簇中 *bglu_2g07420* 基因编码一种含有 DUF2169 和一个五肽重复序列的多结构域蛋白^[78]。T6SS 发挥功能需要 13 个核心蛋白和多个 T6SS 辅助蛋白共同参与, *bglu_2g07420* 基因编码的多结构域蛋白便是其中的一种辅助蛋白^[78]。通过对 *bglu_2g07420* 编码蛋白的 2 个结构域分别缺失突变得得到 $\Delta u2g07420_DUF2169$ 和 $\Delta u2g07420_PPR$ 突变株, 这 2 种突变株相较野生菌均表现出较弱的毒力表型^[78]。说明在 *bglu_2g07420* 所编码的蛋白中 N 端的 DUF2169 结构域以及 C 端的五肽

表 2 T6SS 在植物相关细菌中的功能

Table 2 Function of T6SS in plant bacteria-plant interactions

Strain	Host	Function of T6SS	References
<i>B. glumae</i> BGR1	Rice	Virulence	[77-78]
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> PXO99 ^A	Rice	Virulence	[52]
<i>R. solanacearum</i> Rs-09-161	Eggplant, tomato	Virulence	[79]
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> M228	Kiwifruit	Virulence	[51]
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> CIO151	Cassava	Virulence	[35]
<i>P. atrorepticum</i> SCRI1043	Potato	Virulence	[80]
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> M228	Kiwifruit	Biofilm formation	[51]
<i>A. citrulli</i> xjl12	Melon	Biofilm formation	[81]
<i>A. avenae</i> subsp. <i>Avenae</i> RS-2	Rice	Biofilm formation Motility	[82]
<i>P. fluorescens</i> MFE01	Potato	Biofilm formation	[83]
<i>R. solanacearum</i> GMI1000	Tomato	Biofilm formation	[84]
<i>A. citrulli</i> Aac5	Watermelon	Biofilm formation	[85]
<i>P. phymatum</i> STM815	Phaseolus vulgaris	Motility	[86]
<i>Enterobacter</i> sp. J49	Peanut	Colonization	[87]
<i>Azoarcus</i> sp. BH72	Rice	Colonization	[88]
<i>Kosakonia</i> sp. KO348	Rice	Colonization	[89]
<i>P. fluorescens</i> F113	Tomato	Colonization	[68]
<i>Rhizobium etli</i> Mim1	Bean	Symbiosis	[90]
<i>Bradyrhizobium</i> sp. LmicA16	Lupines	Symbiosis	[91]

重复区都参与且增强 BGR1 的毒力^[78]。同时 *bglu_2g07420* 的下游基因 *bglu_2g07410* 编码另一个五肽重复蛋白, 该蛋白缺失同样也表现出较野生菌更弱的毒力, 说明 *bglu_2g07410* 编码的五肽重复蛋白也为增强细菌毒力提供力量^[78]。曾有研究在动物细菌中发现 T6SS-5 基因簇中所编码的蛋白 TagA/B-5 是由 DUF2169 结构域和五肽重复区域组成的多结构域蛋白, 并且 TagA/B-5 是该菌对多核巨细胞产生毒性必不可少的^[92]。因此, Kim 等认为 BGR1 中 *bglu_2g07420* 编码的含 DUF2169 结构域的蛋白也是该细菌毒力所必需的^[78]。T6SS 的辅助蛋白通常被认为是一种接头蛋白, 因此 *bglu_2g07420* 编码含有 DUF2169 结构域的辅助蛋白很有可能是一个潜在的 T6SS 接头蛋白^[78]。如果该蛋白与 VgrG 或特定的依赖 T6SS 的效应蛋白存在相互作用便

可以证实其为 T6SS 接头蛋白。同时这也是首次在荚壳伯克霍尔德氏菌中发现与细菌毒力相关的 T6SS 辅助蛋白^[78], 这有助于进一步了解 T6SS 对细菌毒力的影响, 也有助于进一步探究细菌毒力对植物的影响。

除此之外, 引起水稻白叶枯病的水稻黄单胞菌水稻致病变种菌株 PXO99^A 中含有 2 个 T6SS 簇, 其中 T6SS-2 重要结构基因 *hcp2* 的缺失会使该菌所引起水稻枯萎的表型减弱, 说明 T6SS 功能的缺失是该菌毒力减弱的主要原因^[52]。引发茄科植物青枯病的茄科罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 菌株 Rs-09-161 可诱导茄子幼苗侵染性枯萎, 5 d 内枯萎达到 50% 以上, 而在同样时间内 T6SS 缺失突变株诱导茄子幼苗枯萎的比例不到 37%^[79], 说明 T6SS 是茄科罗尔斯通氏菌发挥毒力所必需的^[79]。菜豆黄单

胞菌木薯萎蔫致病变种(*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*)菌株 CIO151 中通过构建 T6SS 相关基因 *vgrG*、*clpV* 以及 *hcp* 的缺失突变株并对木薯植株侵染, T6SS 缺失突变株侵染的木薯植株萎蔫程度较野生型有所减弱, 说明 T6SS 可以增强菜豆黄单胞菌对木薯植物的毒性^[35]。另外, 在从感染细菌性溃烂病的猕猴桃中分离所得到的丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)菌株 M228 中, T6SS 对该菌对猕猴桃的致病能力具有促进作用^[35]。当 M228 中 T6SS 的核心基因缺失突变后, 该菌致病能力有不同程度的降低。其中突变 T6SS 核心基因 *tssM* 和 *tssJ* 后使该菌对猕猴桃枝条的毒力分别降低了 78.7%和 71.3%^[51]。因此, 对于大多植物病原细菌而言, T6SS 被认为可以作为毒力因子发挥作用, 促进细菌毒力, 这与一直以来对 T6SS 的认识保持一致。

当一些研究结果倾向于表明 T6SS 具有致病作用时, 另一些研究结果却认为 T6SS 可能在降低细菌对宿主细胞的致病性方面也发挥功能。这种功能在促进细菌与植物宿主间竞争的同时避开对植物宿主的致病作用, 从而使细菌与植物宿主处于共生状态^[93]。早在 2007 年 Mattinen 等便发现 T6SS 对黑腐坚固杆菌(*Pectobacterium atrosepticum*)菌株 SCRI1043 的毒力具有抑制作用^[94]。黑腐坚固杆菌是一种引起马铃薯块茎软腐病的果胶溶解细菌, 也是最早被发现 T6SS 活性与其毒力有关的植物病原细菌^[80]。这种细菌含有单一的 T6SS, T6SS 相关基因 *vasK* 和 *vasH* 在细菌侵染马铃薯块茎过程中高度表达, 且这 2 种基因缺失的突变株使马铃薯块茎的腐烂程度与野生型菌株相比更为严重, 说明 T6SS 的功能缺失增强了 SCRI1043 的毒力^[94]。这一现象可能与突变株在植物宿主中更具生长优势有关, 与野生型相比 T6SS 突

变株产生更多的组织软化酶导致马铃薯块茎腐烂更严重^[94]。也就是说在黑腐坚固杆菌菌株 SCRI1043 中 T6SS 对该菌引起马铃薯块茎腐烂病具有抑制作用, 这一发现拓展了 T6SS 在介导细菌与植物间互作方面的功能。

综上所述, 在大多情况下 T6SS 在植物相关细菌引起植物病害过程中起增强细菌毒力的作用, 但在部分植物相关细菌中 T6SS 的功能恰好相反^[94]。尽管许多研究已经暗示 T6SS 与植物相关细菌的毒力相关, 但是到目前为止 T6SS 影响植物相关细菌毒力的机制尚未得到解析。作为一个蛋白分泌系统, T6SS 的生物学功能主要是由其所分泌效应蛋白的功能而决定, 因此我们有理由相信植物相关细菌主要是通过 T6SS 将效应蛋白转位至植物宿主细胞而发挥毒性作用。另外, 根据 T6SS 介导抗菌的特性, 该分泌系统对植物病原细菌致病性的影响也可能是通过介导抑制其他植物相关细菌, 干扰植物体内微生物菌群的平衡而实现的。

3.2 T6SS 影响植物相关细菌的生物被膜形成及运动性

细菌生物被膜是包裹在自我合成的细胞外聚合物(extracellular polymers, EPS)中并附着在组织表面上的结构化微生物群落, 其中包括胞外多糖、基质蛋白和细胞外 DNA^[95]。大多数细菌生活在生物被膜中, 生物被膜为细菌的生存提供保护^[84]。生物被膜的形成受到细菌运动性的影响, 细菌的生长或附着会对细菌的运动性存在促进作用, 而由于饥饿、捕食或寄生所导致的细菌种群大小的减少则会抑制细菌的运动性^[96-97]。在动物病原细菌中大量研究表明 T6SS 与生物被膜的形成以及运动性相关联^[98-99]。例如铜绿假单胞菌中 *icmF3* 的缺失突变株与野生型相比能更有效地在非生物表面形成生物被膜^[100], 而在致病性大肠杆菌中, *icmF* 的突变

导致该菌在非生物表面上的生物被膜形成存在缺陷^[101]。同样,植物相关细菌中 T6SS 也影响细菌运动性以及生物被膜的形成^[35]。茄科罗尔斯通氏菌菌株 GMI1000 可以在植物宿主表面形成生物被膜状聚集体^[84]。当 T6SS 核心基因 *tssB* 缺失时, GMI1000 生物被膜形成量减少,说明 *tssB* 突变抑制茄科罗尔斯通氏菌生物被膜的形成^[84]。T6SS 在丁香假单胞菌猕猴桃致病变种菌株 M228 生物被膜的形成过程中也具有重要的作用^[51]。当敲除整个 T6SS 基因簇时该菌生物被膜的形成量显著低于野生型,减少了 53.8%,而单独缺失突变 T6SS 关键基因 *tssM*、*tssJ* 时该菌生物被膜的形成量较野生型分别减少了 29.5%和 38.7%^[51]。说明 T6SS 可以促进丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 M228 生物被膜的形成。除此之外,西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*)菌株 xjl12^[81]、燕麦食酸菌燕麦亚种(*Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*)菌株 RS-2^[82]中 T6SS 关键基因的缺失均会影响细菌生物被膜的形成,导致生物被膜的形成较野生型明显减少。与影响生物被膜的表型相类似,与野生型相比燕麦食酸菌燕麦亚种 RS-2 中 T6SS 关键基因 *pppA*、*clpB*、*icmF* 和 *hcp* 缺失突变株的运动能力下降了 37.5%–44.6%^[82]。然而在西瓜食酸菌菌株 Aac5 中 T6SS 则会对该菌生物被膜的形成产生抑制作用^[85]。当缺失突变西瓜食酸菌菌株 Aac5 中 T6SS 关键基因 *hcp* 以及 *tssM* 时,该菌生物被膜的形成量均多于野生型^[85]。这与先前在西瓜嗜酸菌菌株 xjl12 中 T6SS 促进生物被膜形成的表型正好相反。因此, T6SS 在植物病原细菌生物被膜形成和运动性方面都具有重要的作用。然而在有些植物病原细菌中 T6SS 对生物被膜的形成具有促进作用,而在另一些植物病原细菌中 T6SS 对生物被膜的形成却显示出抑制作用。

不仅在植物病原细菌中,在植物非病原细菌中 T6SS 与细菌生物被膜形成及运动性之间也存在联系。荧光假单胞菌菌株 MFE01 中 T6SS 核心基因 *tssC* 的缺失突变株所形成的生物被膜明显少于野生菌,并且当 MFE01 与从人类皮肤中分离的另一种荧光假单胞菌 MFP05 共培养时, MFP05 的生物被膜形成量受到抑制而 *tssC* 的缺失突变株则没有这种抑制效果^[83]。这说明 MFE01 中 T6SS 不仅是自身生物被膜形成的影响因素,还可以抑制与 MFE01 共培养的其他细菌生物被膜的形成^[83]。除此之外,在植物非病原细菌中 T6SS 对细菌运动性也存在明显的影响。从根瘤中分离出具有较强结瘤能力的瘤块副伯克霍尔德氏菌菌株 STM815 中存在 2 套 T6SS (T6SS-b 和 T6SS-3),单独突变 T6SS-b 时该菌的运动能力下降 29%,2 套 T6SS 均突变时其运动能力下降 21%,而单独突变 T6SS-3 则对该菌的运动能力无影响^[86]。说明在瘤块副伯克霍尔德氏菌菌株 STM815 中只有 T6SS-b 影响该菌的运动能力,并且对该菌的运动能力具有促进作用^[86]。

综上所述,无论是植物病原细菌还是植物非病原细菌, T6SS 都可以影响其生物被膜的形成和运动性。尽管研究表明 T6SS 基因簇突变对细菌生物被膜的形成具有重要影响,但是这种影响的具体机制尚不明确。在禽类致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)中, T6SS 结构蛋白 IcmF 的缺失表现出 APEC 生物被膜形成缺陷,并且该 T6SS 突变体与 HeLa 细胞的黏附丧失有关^[101]。因此推测细菌生物被膜与 T6SS 之间联系可能依赖生物被膜中黏附素的分泌,但这种预测是否同样适用于植物相关细菌还未得到验证。另外, T6SS 中一些调节元件也可能参与调节生物被膜的形成,例如霍乱弧菌中调节因子 VxrB 正向调节细菌生

物被膜基质的产生以及 T6SS 基因的表达^[102], 这也许可以对在 T6SS 突变体中观察到的生物被膜缺陷的表型做出部分解释。

3.3 T6SS 影响细菌在植物中的定殖

研究表明 T6SS 在植物生长促进菌(plant growth promoting bacteria, PGPB)在植物中的定殖过程中发挥重要的作用^[87]。PGPB 是一组有益的微生物, 可以通过改善植物养分获取影响植物激素水平或通过减少各种病原体对植物发育的不利影响来提高植物的适应性和发育^[103]。PGPB 可以通过多种机制促进植物生长, 例如固氮、溶解不溶性土壤磷酸盐、产生植物激素等^[104]。近期 Lucero 等在花生内发现一种能够定殖于豆科植物, 且具有高效溶解磷酸盐能力的肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)菌株 J49^[87]。J49 中含有 13 个 T6SS 结构蛋白, 2 个 T6SS 相关蛋白。J49 中, 当 T6SS 结构基因 *hcp* 缺失突变时, J49 在植株根部及气生组织的附生定制率、植株气生组织的内生定殖率显著下降, 与植物定殖相关的指标如生物被膜的形成量、多聚半乳糖醛酸酶的产量均小于野生型菌株^[87]。T6SS 功能缺失使 J49 在豆科植物中的定殖能力显著减弱, 说明 T6SS 对该菌在豆科植物中的定殖具有促进作用。另外, 在小浴氏菌属(*Kosakonia* sp.)菌株 KO348、荧光假单胞菌 F113 中也观察到了类似的现象, 在这 2 种菌株中 T6SS 缺失突变时均表现出在根部定殖能力显著下降的表型^[68-69]。综上所述可知, 在部分 PGPB 中 T6SS 可以促进其在植物内部或根部的定殖。与此相反的是, T6SS 似乎也可以抑制细菌在植物根部的定殖^[88]。Shidore 等发现在固氮弯曲菌属(*Azoarcus* sp.)菌株 BH72 中, 当等量野生型菌株 BH72 和 T6SS 突变株 BHazo3888 分别侵染水稻幼苗时, BHazo3888 表现出更强的在水稻根部定殖能力, 表明 T6SS 的缺失可以促进 BH72 在水稻根

部的定殖^[88]。因此, 在不同的植物相关细菌中 T6SS 对其定殖能力具有不同的影响, 部分菌株中表现为促进细菌定殖, 而部分菌株中则表现为抑制细菌定殖。

除此之外, 土壤中的根瘤菌也可以在豆科植物中定殖。根瘤菌通过定殖于豆科植物而与豆科植物之间建立共生关系, 帮助豆科植物获取生长所需的氮, 减少农业发展过程中氮肥的使用, 有效降低了化学药品对生态环境的负面影响^[105]。T6SS 基因簇存在于多种根瘤菌属中, 包括慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)等^[90]。起初, 研究人员认为 T6SS 基因突变不影响根瘤菌与豆科植物之间的共生效果而是影响共生竞争力^[73,106]。然而这一观点随后于 2019 年被 Salinero-Lanzarote 等推翻, Salinero-Lanzarote 等发现在豆根瘤菌(*Rhizobium etli*)菌株 Mim1 诱导形成的菜豆根瘤中 T6SS 表达十分活跃^[90]。同时与野生型菌株相比, Mim1 中 T6SS 结构基因突变后所产生的植株干重, 根瘤大小均小于野生型^[90]。这一结果首次表明 T6SS 在根瘤菌与豆科植物共生中起到促进作用^[90]。另外, 慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium* sp.)菌株 LmicA16 中 T6SS 也可以促进该菌与豆科植物间的共生^[91]。当突变 T6SS 结构蛋白 VgrG 时, 与野生型菌株相比, 突变株诱导产生的根瘤更少, 根瘤定殖水平显著降低^[91]。同时, 在 LmicA16 的 T6SS 基因簇中发现一个功能未知但含有甲基转移酶结构域的蛋白 Tsb1, 突变 *tsb1* 时该菌表现出介于野生型与 *vgrG* 突变株之间的共生表型。因此推测 Tsb1 可能是一种依赖 T6SS 且促进慢生根瘤菌与豆科植物之间共生的效应蛋白, 但还需要进一步的工作来验证并探究其在共生关系中的具体作用^[91]。

综上所述, T6SS 不仅对植物相关细菌在植物中的定殖能力存在促进和抑制 2 种不同的影响, 在根瘤菌属细菌中还可以促进根瘤菌与豆科植物之间的共生作用。推测 T6SS 对植物相关细菌在植物中的定殖能力的影响可能与 T6SS 分泌的效应蛋白有关, 植物相关细菌 T6SS 分泌效应蛋白触发植物的局部防御反应对野生型菌株产生杀伤作用。T6SS 突变体因无法分泌效应蛋白, 不会触发植物的局部防御反应, 进而使细菌能够更有效地定殖于植物中。当然, 这只能解释 T6SS 如何抑制细菌在植物中的定殖。关于 T6SS 促进细菌在植物中定殖的观点则可能通过其效应蛋白抑制植物局部防御反应来解释。因此, 如能鉴定一个作用于植物并对植物局部防御反应具有影响的 T6SS 效应蛋白, 这无疑将是 T6SS 研究领域的一个新的突破。

4 植物相关细菌 T6SS 与生物防治

作物病害一直是造成粮食严重损失并影响其可持续供应的长期问题之一。虽然化学农药可以预防作物病害, 但过度使用化学农药会对人类和环境健康造成有害影响^[107], 土壤中农药成分也会对根际微生物群落之间相互作用以及

植物生长产生负面影响^[108]。当前微生物菌剂已被视为有毒化学农药可行且环保的替代品, 使用有益微生物菌剂能够在抑制病原菌的同时改善环境和人类安全问题^[109]。细菌在与其他根际细菌直接接触的过程中会利用 T6SS 向竞争对手释放毒性以至于保全自身^[110], 许多作为生防菌的植物有益细菌中都含有 T6SS。有趣的是, 编码 T6SS 的生防菌大多属于假单胞菌属, 例如恶臭假单胞菌, 荧光假单胞菌、保护假单胞菌等^[49,111-113], 这些假单胞菌能够通过多种方式抑制植物病害, 被认为是重要的生防菌剂来源^[114-116](表 3)。

4.1 抑制植物病原细菌

铜绿假单胞菌通常被认为是一种动物病原细菌, 同时该菌也是重要的植物内生菌可作生防菌对植物起保护作用^[119]。近期, Khan 等在百合中分离到铜绿假单胞菌菌株 LD-08 可抑制多种植物病原真菌, 并且 LD-08 的乙酸乙酯提取物中大多数化合物都是先前报道的抗菌剂^[119]。同时 LD-08 能促进百合的生长, 对株高、叶长、鳞茎重、根长等生长指标有显著的促进作用, 这都表明铜绿假单胞菌在促进植物生长和生物防治方面具有巨大的开发潜力^[119]。铜绿假单胞菌作为 T6SS 研究的模式菌株, T6SS 在其生物防治过程中发挥重要作用。铜绿假单胞菌菌株 VIH2 可依赖 HIS-I T6SS 发挥毒力, 对茄科罗尔

表 3 T6SS 在生物防治中的功能

Table 3 Function of T6SS in plant-associated bacterial biocontrol

Biocontrol	Controlled	Function of T6SS	References
<i>P. aeruginosa</i> VIH2	<i>R. solanacearum</i>	Inhibit pathogenic bacteria	[117]
<i>P. fluorescens</i> MFE01	<i>P. atrosepticum</i>	Inhibit pathogenic bacteria	[118]
<i>P. fluorescens</i> Pf29Arp	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	Inhibit pathogenic bacteria	[113]
<i>P. putida</i> KT2440	<i>X. campestris</i>	Inhibit pathogenic bacteria	[49]
<i>P. taiwanensis</i> CMS ^T	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Competition iron	[60]
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> 30-84	<i>D. discoideum</i>	Reduced predator feeding	[13]
	<i>T. thermophila</i>	Increased predator stress	
	<i>C. elegans</i>		
<i>P. protegens</i> CHA0	<i>P. brassicae</i>	Induces significant changes in the insect gut microbiome	[112]

斯通氏菌产生拮抗作用抑制其生长, 然而当 HIS-I T6SS 调控基因 *ppkA* 突变后 VIH2 对茄科罗尔斯通氏菌的拮抗作用明显减弱^[117]。因此, 在铜绿假单胞菌 VIH2 中 T6SS 可促进该菌对植物病原细菌的抑制, 这一发现为铜绿假单胞菌作为生物防治工程菌提供了重要的理论支持^[117]。不仅如此, 植物中常见的另一种含有 T6SS 的假单胞菌——荧光假单胞菌在生物防治过程中也发挥重要的作用。荧光假单胞菌菌株 Pf29Arp 是一种具有保护小麦根部免受小麦全蚀病原真菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* GGT) 侵染的植物共生细菌^[113]。Pf29Arp 中含有 4 个完整的 T6SS 基因簇和 9 个 *vgrG* 基因, 该菌 4 个 T6SS 相关基因 *clpV* 在受 GGT 感染的小麦根部的表达量均高于健康根部, 并且该菌 T6SS 基因簇中的 5 个 *vgrG* 的表达也受 GGT 引起的根部坏死的诱导^[113]。因此 Marchi 等推测 Pf29Arg 中 T6SS 在感染 GGT 的小麦根部的高表达是由于 T6SS 在 Pf29Arg 对 GGT 的抑制作用中发挥功能, 当然这一推测还需要通过 Pf29Arg 中 T6SS 功能缺失突变体进行进一步验证^[113]。另外, 荧光假单胞菌菌株 MFE01 编码一套 T6SS, 并且 T6SS 在该菌对许多常见根际细菌的抑制过程中发挥作用^[118]。例如 MFE01 可以抑制黑腐坚固杆菌, 抵抗马铃薯块茎软腐病, 突变 T6SS 则丧失对黑腐坚固杆菌的抑制效果^[118]。这一表型说明 T6SS 可促进荧光假单胞菌对植物病原细菌的抑制, 从而间接使植物摆脱病原细菌的侵害。另外, 恶臭假单胞菌在生物防治领域也具有一定的贡献。恶臭假单胞菌通常靠近植物根部生长, 是一种可以与植物建立共生关系的植物根际促生菌^[49]。恶臭假单胞菌菌株 KT2440 菌株中含有 3 套 T6SS (K1-、K2-、K3-T6SS), 主要依赖 K1-T6SS 在竞争中战胜大多数细菌, 包括很多植物病原细菌^[49]。利用恶

臭假单胞菌 KT2440 与野油菜黄单胞菌共同侵染烟草叶片, 并使用绿色荧光蛋白标记野油菜黄单胞菌进行原位定殖监测^[49]。发现 2 种菌共同侵染烟草叶片时叶片坏死率显著降低, 且烟草叶片中被标记的野油菜黄单胞菌的数量也明显减少^[49]。而当野油菜黄单胞菌与 KT2440 $\Delta t6ss$ 共同侵染烟草叶片时叶片坏死率及野油菜黄单胞菌数量则恢复至野油菜黄单胞菌单独侵染烟草叶片时的状态^[49]。这些结果表明恶臭假单胞菌对植物叶片的保护是由于野油菜黄单胞菌在叶片中存活率降低而实现的, 且这种保护依赖于 T6SS, 暗示恶臭假单胞菌通过 T6SS 介导在叶片中杀死野油菜黄单胞菌^[49]。

综上所述, 植物中有益假单胞菌可以依赖 T6SS 抑制植物病原细菌, 这种对植物病原细菌的抑制作用似乎是假单胞菌作为生防菌保护植物的主要方式之一。同时这也说明 T6SS 对植物有益菌在生物防治过程中功能的发挥起至关重要的作用。

4.2 分泌铁载体

铁离子等过渡金属离子通常被称为生命金属, 在生物体内参与新陈代谢, 是生物体正常生长所必需的辅因子^[18]。细菌可利用多种方式摄取铁离子以适应缺铁的环境, 例如铜绿假单胞菌在缺铁环境中会产生 2 种铁载体——脓青素(pyoverdine)和螯铁蛋白(pyochelin), 利用这些铁载体螯合胞外铁离子并将其转运进入细胞, 从而帮助铜绿假单胞菌在缺铁环境中更好地获得铁^[36]。分泌铁载体也是细菌间竞争的多种方式中最为经典的一种。细菌通过分泌铁载体摄取生命活动所需的铁离子, 从而在竞争过程中获得生长优势^[120]。因此, 细菌分泌铁载体的能力对其能否成为生防菌具有重要的影响。台湾假单胞菌菌株 CMS^T 便是一种可以依赖 T6SS 分泌铁载体 pyoverdine 的重要生防菌株,

CMS^T可通过 T6SS 分泌 pyoverdine 抑制水稻黄单胞菌的生长^[60]。当台湾假单胞菌 CMS^T 与水稻黄单胞菌在低铁环境中培养时, CMS^T 通过 T6SS 释放 pyoverdine 与水稻黄单胞菌竞争环境中极少量的铁, 使水稻黄单胞菌无法获得生命所需足够的铁而导致其生长受到抑制^[60]。尽管目前已经确定在台湾假单胞菌中 T6SS 对于 pyoverdine 的分泌是必需的, 但 pyoverdine 分泌机制是与效应蛋白类似还是依赖于其他未知的方式还有待进一步研究。

4.3 抵御捕食者

假单胞菌属细菌还可以依赖 T6SS 通过 2 种不同的方式抵抗食细菌原生生物、线性动物以及食草害虫实现“以菌治虫”的生物防治作用。其中绿针假单胞菌产金色亚种 (*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*) 菌株 30-84 是一种良好的植物根际促生菌, 能有效定殖于植物根部^[13]。该菌编码 2 套 T6SS (T6SS-1 和 T6SS-2), 这 2 套 T6SS 至少存在一套即可赋予该菌明显的细菌间竞争优势^[13]。同时, 在 30-84 中存在任意一套 T6SS 便可以对具有不同摄食方式的食细菌原生生物嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*)、盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 以及食细菌线性动物秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的捕食行为产生影响, 即在 30-84 可在 T6SS 的介导下引起捕食者的应激反应甚至阻止捕食者的捕食行为^[13]。因此, 绿针假单胞菌产金色亚种菌株 30-84 中 T6SS 不仅可以使该菌在与其他根际细菌的竞争过程中获取竞争优势, 还可以保护该菌在捕食者的捕食过程中免受伤害, 从而促进植物生长^[13]。另外, 保护假单胞菌菌株 CHA0 可以通过另一种方式实现对捕食者的灭杀。当保护假单胞菌菌株 CHA0 入侵并定殖于食草性害虫——欧洲

粉蝶幼虫 (*Pieris brassicae*) 肠道时, T6SS 促进 CHA0 在与欧洲粉蝶幼虫肠道共生细菌的竞争中获得优势, 改变欧洲粉蝶幼虫肠道微生物群落的组成, 特别是降低了欧洲粉蝶幼虫肠道的主要益生肠杆菌属细菌的比例, 进而导致害虫死亡^[112]。这是首次发现环境中的植物相关细菌可以入侵植物害虫并取代害虫肠道内生细菌, 这与先前霍乱弧菌入侵宿主肠道并取代宿主肠道菌的现象保持一致^[112,121]。这一发现扩大了 T6SS 作为一种毒力武器的可能性, 与此同时为假单胞菌作为生防菌抵御害虫侵害提供了理论基础^[122]。

综上所述, 植物中最常见的有益菌——假单胞菌可依赖 T6SS 对病原细菌产生毒性、与病原细菌竞争铁载体、抑制食细菌捕食者的捕食行为以及破坏食草性害虫肠道菌群等方式达到生物防治的效果。这些示例为假单胞菌属细菌作为生物防治菌株提供重要的理论依据, 为开发新的病原细菌和病虫害防治策略提供更多的可能性, 以达到改善农作物健康状态的功效益, 在农业生产上具有重要的意义。

5 展望

T6SS 是广泛存在于植物相关细菌中的重要系统, 其主要通过将效应蛋白投递到原核细胞、真核细胞或者细胞外环境中而发挥多种生物学功能^[13,39,123]。T6SS 在植物相关细菌中的功能主要表现为: 介导细菌间的竞争、介导细菌与植物宿主之间的相互作用以及介导植物病害生物防治。在介导细菌间的竞争方面, 尽管目前已经有多个介导植物相关细菌间竞争的 T6SS 效应蛋白被鉴定^[15,68], 但是这些效应蛋白的生物学功能尚不完全清楚, 特别是对它们的生化功能的研究只是停留在生物信息学上的分

析预测, 缺少直接的实验数据。另外, 对 T6SS 介导植物相关细菌间竞争的研究主要在植物体外开展, 在植物体内 T6SS 是否同样可以介导植物相关细菌间竞争并因此影响植物微生物群的结构组成, 还有待进一步的研究。在介导细菌与植物宿主之间的相互作用方面, T6SS 的功能更具多样性。既有增强一些植物病原细菌毒力的功能^[51], 也有降低另一些植物病原细菌毒力的作用^[94], 既能促进一些细菌在植物中的定殖^[87], 也能抑制另一些细菌在植物中的定殖^[88]。但是对 T6SS 介导细菌与植物间互作的功能方面的研究, 目前均着眼于现象和表型描述而未进行深入的机制研究, 主要原因可能在于还没有与该功能相关的 T6SS 效应蛋白被鉴定出来。尽管目前已有不少介导植物相关细菌间竞争的 T6SS 效应蛋白被鉴定, 但是它们的功能显然还无法用来解释上述细菌与植物间互作的表型, 暗示这一表型可能是由植物相关细菌中能够直接转位到植物细胞中的 T6SS 效应蛋白所介导。迄今为止, 植物相关细菌中能够直接转位到植物细胞中的 T6SS 效应蛋白还未被鉴定和报道。因此, 如若能鉴定出一个可以转位到植物体内并在植物体内发挥特定的生化及生物学功能的效应蛋白, 无疑将是 T6SS 介导细菌与植物互作研究领域的一个重大突破。在植物病害生物防治方面, 植物生防细菌 T6SS 似乎主要利用其所介导的抗菌作用, 通过抑制植物病原细菌生长和干扰害虫肠道的菌群平衡等方式来实现其生物防治的功能^[112,117,120]。但是这方面的研究工作才刚刚开始, 当下更多的研究是在植物体外开展, 真正用于植物的生物防治时是否能达到预期的效果还有待于深入的研究。特别是植物生防细菌 T6SS 在植物体内是否还能发挥抑制植物病原细菌的功能? 对植物正常的微生物群会造成什么影响? 能否基于 T6SS 通过

人工改造创制植物超级生防细菌? 等这些问题亟待解决。因此, 探究 T6SS 在植物相关细菌间竞争中的作用、在细菌与植物间互作中的作用以及在植物生物防治中的作用分子机制, 不仅是 T6SS 研究的重要方向, 也为植物细菌病害提供靶标, 具有十分重要的科学意义和实践价值。

参考文献

- [1] STUBBENDIECK RM, VARGAS-BAUTISTA C, STRAIGHT PD. Bacterial communities: interactions to scale[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1234.
- [2] 刘琬洋, 权国梅, 刘家奇, 连思琪, 朱国强. 革兰氏阴性菌 VI 型分泌系统及其参与金属离子转运的研究进展. *微生物学报*[J], 2021, 61(11): 3377-3390.
LIU WY, QUAN GM, LIU JQ, LIAN SQ, ZHU GQ. Advances of the Gram-negative bacterial type VI secretion system and its function for metal ion acquisition[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3377-3390 (in Chinese).
- [3] TANG MX, PEI TT, XIANG Q, WANG ZH, LUO H, WANG XY, FU Y, DONG T. Abiotic factors modulate interspecies competition mediated by the type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*[J]. *ISME Journal*, 2022, 16(7): 1765-1775.
- [4] KEMPENICH MW, SISON-MANGUS MP. Presence and abundance of bacteria with the type VI secretion system in a coastal environment and in the global oceans[J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0244217.
- [5] BYUN H, PARK J, FABIA BU, BINGWA J, NGUYEN MH, LEE H, AHN JH. Generalized approach towards secretion-based protein production via neutralization of secretion-preventing cationic substrate residues[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 6700.
- [6] BLEVES S, GALAN JE, LLOSA M. Bacterial injection machines: evolutionary diverse but functionally convergent[J]. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(5): e13157.
- [7] KLEIN TA, AHMAD S, WHITNEY JC. Contact-dependent interbacterial antagonism mediated by protein secretion machines[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(5): 387-400.

- [8] JACKSON-LITTEKEN CD, di VENANZIO G, LE NH, SCOTT NE, DJAHANSCHIRI B, DISTEL JS, PARDUE EJ, EBERSBERGER I, FELDMAN MF. InvL, an invasin-like adhesin, is a type II secretion system substrate required for *Acinetobacter baumannii* uropathogenesis[J]. *mBio*, 2022, 13(3): e0025822.
- [9] LIANG ZJ, WU HZ, BIAN C, CHEN H, SHEN YL, GAO XP, MA JL, YAO HC, WANG LP, WU ZF. The antimicrobial systems of *Streptococcus suis* promote niche competition in pig tonsils[J]. *Virulence*, 2022, 13(1): 781-793.
- [10] GORASIA DG, SEERS CA, HEATH JE, GLEW MD, SOLEIMANINEJAD H, BUTLER CA, MCBRIDE MJ, VEITH PD, REYNOLDS EC. Type B CTD proteins secreted by the type IX secretion system associate with PorP-like proteins for cell surface anchorage[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5681.
- [11] SANA TG, VOULHOUX R, MONACK DM, IZE B, BLEVES S. Editorial: protein export and secretion among bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 473.
- [12] CIAMAK G. Export pathways and mechanisms in secretion of proteins among bacterial pathogens[J]. *Reviews in Medical Microbiology*, 2019, 30(1): 62-68.
- [13] BOAK EN, KIROLOS S, PAN H, PIERSON LS, PIERSON EA. The type VI secretion systems in plant-beneficial bacteria modulate prokaryotic and eukaryotic interactions in the rhizosphere[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 843092.
- [14] LEGOFF M, VASTEL M, LEBRUN R, MANSUELLE P, DIARRA A, GRANDJEAN T, TRIPONNEY P, IMBERT G, GOSSET P, DESSEIN R, GARNIER F, DURAND E. Characterization of the *Achromobacter xylosoxidans* type VI secretion system and its implication in cystic fibrosis[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 859181.
- [15] YU M, WANG YC, HUANG CJ, MA LS, LAI EM. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a versatile antibacterial strategy to increase its competitiveness[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(3): e00490-00420.
- [16] CHEN L, ZOU Y, KRONFL AA, WU Y. Type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with biofilm formation but not environmental adaptation[J]. *Microbiology Open*, 2020, 9(3): e991.
- [17] YANG XY, LI ZQ, GAO ZQ, WANG WJ, GENG Z, XU JH, SHE Z, DONG YH. Structural and SAXS analysis of Tle5-Tli5 complex reveals a novel inhibition mechanism of H2-T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Protein Science*, 2017, 26(10): 2083-2091.
- [18] LIN JS, ZHANG WP, CHENG JL, YANG X, ZHU KX, WANG Y, WEI GH, QIAN PY, LUO ZQ, SHEN XH. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14888.
- [19] HAN YY, WANG TT, CHEN GK, PU QQ, LIU Q, ZHANG YN, XU LH, WU M, LIANG HH. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(12): e1008198.
- [20] TAYLOR NMI, van RAAIJ MJ, LEIMAN PG. Contractile injection systems of bacteriophages and related systems[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 108(1): 6-15.
- [21] SANTIN YG, DOAN T, LEBRUN R, ESPINOSA L, JOURNET L, CASCALES E. *In vivo* TssA proximity labelling during type VI secretion biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(11): 1304-1313.
- [22] ZHENG HY, YANG L, DONG T. More than just a spearhead: diverse functions of PAAR for assembly and delivery of toxins of the contractile injection systems[J]. *mSystems*, 2021, 6(6): e0138621.
- [23] STIETZ MS, LIANG X, LI H, ZHANG X, DONG TG. TssA-TssM-TagA interaction modulates type VI secretion system sheath-tube assembly in *Vibrio cholerae*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5065.
- [24] CHERRAK Y, FLAUGNATTI N, DURAND E, JOURNET L, CASCALES E. Structure and activity of the type VI secretion system[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(4): PSIB-0031-2019.
- [25] PARK YJ, LACOURSE KD, CABBILLAU C, DIMAIO F, MOUGOUS JD, VEESLER D. Structure of the type VI secretion system TssK-TssF-TssG baseplate subcomplex revealed by cryo-electron microscopy[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5385.
- [26] BASLER M, PILHOFER M, HENDERSON GP, JENSEN GJ, MEKALANOS JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure[J]. *Nature*, 2012, 483(7388): 182-186.
- [27] 袁思琪, 李倩, 毛旭虎. 细菌VI型分泌系统的调控与功能研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(2): 620-626.
- YUAN SQ, LI Q, MAO XH. Advances in regulation and function of the bacterial type VI secretion system[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(2): 620-626 (in Chinese).

- [28] NGUYEN VS, SPINELLI S, CASCALES E, ROUSSEL A, CABBILLAU C, LEONE P. Anchoring the T6SS to the cell wall: crystal structure of the peptidoglycan binding domain of the TagL accessory protein[J]. PLoS One, 2021, 16(7): e0254232.
- [29] DURAND E, NGUYEN VS, ZOUED A, LOGGER L, PEHAU-ARNAUDET G, ASCHTGEN MS, SPINELLI S, DESMYTER A, BARDIAUX B, DUJEANCOURT A, ROUSSEL A, CABBILLAU C, CASCALES E, FRONZES R. Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex[J]. Nature, 2015, 523(7562): 555-560.
- [30] KUDRYASHEV M, WANG RY, BRACKMANN M, SCHERER S, MAIER T, BAKER D, DIMAIO F, STAHLBERG H, EGELMAN EH, BASLER M. Structure of the type VI secretion system contractile sheath[J]. Cell, 2015, 160(5): 952-962.
- [31] ZOUED A, DURAND E, BRUNET YR, SPINELLI S, DOUZI B, GUZZO M, FLAUGNATTI N, LEGRAND P, JOURNET L, FRONZES R, MIGNOT T, CABBILLAU C, CASCALES E. Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure[J]. Nature, 2016, 531(7592): 59-63.
- [32] YU KW, XUE P, FU Y, YANG L. T6SS mediated stress responses for bacterial environmental survival and host adaptation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 478.
- [33] RUHE ZC, LOW DA, HAYES CS. Polymorphic toxins and their immunity proteins: diversity, evolution, and mechanisms of delivery[J]. Annual Review of Microbiology, 2020, 74: 497-520.
- [34] LENNINGS J, MAYER C, MAKHLOUF M, BROTZ-OESTERHELT H, SCHWARZ S. Polar localization of the ATPase ClpV-5 occurs independent of type VI secretion system apparatus proteins in *Burkholderia thailandensis*[J]. BMC Research Notes, 2019, 12(1): 109.
- [35] MONTENEGRO BENAVIDES NA, ALVAREZ BA, ARRIETA-ORTIZ ML, RODRIGUEZ RL, BOTERO D, TABIMA JF, CASTIBLANCO L, TRUJILLO C, RESTREPO S, BERNAL A. The type VI secretion system of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* is involved in virulence and *in vitro* motility[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 14.
- [36] 杨建社, 王帅涛, 牛艳婷, 林金水. 铜绿假单胞菌 T6SS 的组装、分泌、功能和调控[J]. 微生物学报, 2021, 61(9): 2607-2627.
- YANG JS, WANG ST, NIU YT, LIN JS. Assembly, secretion, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(9): 2607-2627 (in Chinese).
- [37] 梁小夜, 许平, 董涛. 从效应蛋白视角看革兰氏阴性细菌 VI 型蛋白分泌系统底物转运机理[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 339-344.
- LIANG XY, XU P, DONG T. Effector recognition and translocation by type VI protein secretion system in Gram-negative bacteria[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 339-344. (in Chinese).
- [38] MORGADO S, VICENTE AC. Diversity and distribution of type VI secretion system gene clusters in bacterial plasmids[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 8249.
- [39] CAROBBI A, DI NEPI S, FRIDMAN CM, DAR Y, BEN-YAAKOV R, BARASH I, SALOMON D, SESSA G. An antibacterial T6SS in *Pantoea agglomerans* pv. *betae* delivers a lysozyme-like effector to antagonize competitors[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(10): 4787-4802.
- [40] LIN JS, XU L, YANG JS, WANG Z, SHEN XH. Beyond dueling: roles of the type VI secretion system in microbiome modulation, pathogenesis and stress resistance[J]. Stress Biology, 2021, 1(1): 11.
- [41] QUENTIN D, AHMAD S, SHANTHAMOORTHY P, MOUGOUS JD, WHITNEY JC, RAUNSER S. Mechanism of loading and translocation of type VI secretion system effector Tse6[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(10): 1142-1152.
- [42] WETTSTADT S, WOOD TE, FECHT S, FILLOUX A. Delivery of the *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase effectors PldA and PldB in a VgrG- and H2-T6SS-dependent manner[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1718.
- [43] WOOD TE, HOWARD SA, WETTSTADT S, FILLOUX A. PAAR proteins act as the 'sorting hat' of the type VI secretion system[J]. Microbiology, 2019, 165(11): 1203-1218.
- [44] MANERA K, KAMAL F, BURKINSHAW B, DONG TG. Essential functions of chaperones and adaptors of protein secretion systems in Gram-negative bacteria[J]. FEBS Journal, 2021, 289(16): 4704-4717.
- [45] UNTERWEGER D, KOSTIUK B, OTJENGERDES R, WILTON A, DIAZ-SATIZABAL L, PUKATZKI S. Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*[J]. EMBO Journal, 2015, 34(16): 2198-2210.

- [46] BINGLE LE, BAILEY CM, PALLEN MJ. Type VI secretion: a beginner's guide[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(1): 3-8.
- [47] BERNAL P, LLAMAS MA, FILLOUX A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(1): 1-15.
- [48] ALDERLEY CL, GREENROD STE, FRIMAN VP. Plant pathogenic bacterium can rapidly evolve tolerance to an antimicrobial plant allelochemical[J]. *Evolutionary Applications*, 2022, 15(5): 735-750.
- [49] BERNAL P, ALLSOPP LP, FILLOUX A, LLAMAS MA. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens[J]. *ISME Journal*, 2017, 11(4): 972-987.
- [50] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, CITOVSKY V, SRIARIYANUM M, RONALD P, DOW M, VERDIER V, BEER SV, MACHADO MA, TOTH I, SALMOND G, FOSTER GD. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(6): 614-629.
- [51] WANG NN, HAN N, TIAN RZ, CHEN JL, GAO XN, WU ZR, LIU YQ, HUANG LL. Role of the type VI secretion system in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causative agent of kiwifruit bacterial canker[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 627785.
- [52] CHOI Y, KIM N, MANNAA M, KIM H, PARK J, JUNG H, HAN G, LEE HH, SEO YS. Characterization of type VI secretion system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and its role in virulence to rice[J]. *Plant Pathology Journal*, 2020, 36(3): 289-296.
- [53] GALLEGOS-MONTERROSA R, COULTHURST SJ. The ecological impact of a bacterial weapon: microbial interactions and the type VI secretion system[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2021, 45(6): 1-18.
- [54] ADEDAYO AA, BABALOLA OO, PRIGENT-COMBARET C, CRUZ C, STEFAN M, KUTU F, GLICK BR. The application of plant growth-promoting rhizobacteria in *Solanum lycopersicum* production in the agricultural system: a review[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13405.
- [55] BEN ROMDHANE S, de LAJUDIE P, FUHRMANN JJ, MRABET M. Potential role of rhizobia to enhance chickpea-growth and yield in low fertility-soils of Tunisia[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2022, 115(7): 921-932.
- [56] SAEED Q, XIUKANG W, HAIDER FU, KUCERIK J, MUMTAZ MZ, HOLATKO J, NASEEM M, KINTL A, EJAZ M, NAVEED M, BRTNICKY M, MUSTAFA A. Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: a comprehensive review of effects and mechanisms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10529.
- [57] BLADERGROEN MR, BADELT K, SPAINK HP. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(1): 53-64.
- [58] NETT RS, BENDER KS, PETERS RJ. Production of the plant hormone gibberellin by rhizobia increases host legume nodule size[J]. *ISME Journal*, 2022, 16(7): 1809-1817.
- [59] JACH ME, SAJNAGA E, ZIAJA M. Utilization of legume-nodule bacterial symbiosis in phytoremediation of heavy metal-contaminated soils[J]. *Biology*, 2022, 11(5): 676.
- [60] CHEN WJ, KUO TY, HSIEH FC, CHEN PY, WANG CS, SHIH YL, LAI YM, LIU JR, YANG YL, SHIH MC. Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32950.
- [61] WANG TT, SI M, SONG YH, ZHU WH, GAO F, WANG Y, ZHANG L, ZHANG WP, WEI GH, LUO ZQ, SHEN XH. Type VI secretion system transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1005020.
- [62] SI M, ZHAO C, BURKINSHAW B, ZHANG B, WEI D, WANG Y, DONG TG, SHEN X. Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(11): E2233-E2242.
- [63] WANG TT, DU X, JI LX, HAN YY, DANG J, WEN J, WANG YR, PU QQ, WU M, LIANG HH. *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-mediated molybdate transport contributes to bacterial competition during anaerobiosis[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(2): 108957.
- [64] PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, KRSTINS B, SARRACINO D, NELSON WC, HEIDELBERG JF, MEKALANOS JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the dictyostelium host model system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1528-1533.
- [65] MOUGOUS JD, CUFF ME, RAUNSER S, SHEN A, ZHOU M, GIFFORD CA, GOODMAN AL,

- JOACHIMIAK G, ORDONEZ CL, LORY S, WALZ T, JOACHIMIAK A, MEKALANOS JJ. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus[J]. *Science*, 2006, 312(5779): 1526-1530.
- [66] MA LS, HACHANI A, LIN JS, FILLOUX A, LAI EM. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta[J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 16(1): 94-104.
- [67] TANG JY, BULLEN NP, AHMAD S, WHITNEY JC. Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(5): 1504-1514.
- [68] DURAN D, BERNAL P, VAZQUEZ-ARIAS D, BLANCO-ROMERO E, GARRIDO-SANZ D, REDONDO-NIETO M, RIVILLA R, MARTIN M. *Pseudomonas fluorescens* F113 type VI secretion systems mediate bacterial killing and adaptation to the rhizosphere microbiome[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 5772.
- [69] WHITNEY JC, CHOU S, RUSSELL AB, BIBOY J, GARDINER TE, FERRIN MA, BRITNACHER M, VOLLMER W, MOUGOUS JD. Identification, structure, and function of a novel type VI secretion peptidoglycan glycoside hydrolase effector-immunity pair[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(37): 26616-26624.
- [70] LI YY, YAN XJ, TAO Z. Two type VI secretion DNase effectors are utilized for interbacterial competition in the fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 869278.
- [71] RADKOV A, SAPIRO AL, FLORES S, HENDERSON C, SAUNDERS H, KIM R, MASSA S, THOMPSON S, MATEUSIAK C, BIBOY J, ZHAO ZY, STARITA LM, HATLEBERG WL, VOLLMER W, RUSSELL AB, SIMORRE J, ANTHONY-CAHILL S, BRZOVIC P, HAYES B, CHOU S. Antibacterial potency of type VI amidase effector toxins is dependent on substrate topology and cellular context[J]. *eLife*, 2022, 11: e79796.
- [72] HUANG FC, CHI SF, CHIEN PR, LIU YT, CHANG HN, LIN CS, HWANG HH. *Arabidopsis* RAB8A, RAB8B and RAB8D proteins interact with several RTNLB proteins and are involved in the *Agrobacterium tumefaciens* infection process[J]. *Plant Cell Physiology*, 2021, 62(10): 1572-1588.
- [73] de CAMPOS SB, LARDI M, GANDOLFI A, EBERL L, PESSI G. Mutations in two *Paraburkholderia phymatum* type VI secretion systems cause reduced fitness in interbacterial competition[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2473.
- [74] ZHU PC, LI YM, YANG X, ZOU HF, ZHU XL, NIU XN, XU LH, JIANG W, HUANG S, TANG JL, HE YQ. Type VI secretion system is not required for virulence on rice but for inter-bacterial competition in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*[J]. *Research in Microbiology*, 2020, 171(2): 64-73.
- [75] SHYNTUM DY, NKOMO NP, SHINGANGE NL, GRICIA AR, BELLIENY-RABELO D, MOLELEKI LN. The impact of type VI secretion system, bacteriocins and antibiotics on bacterial competition of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and the regulation of carbapenem biosynthesis by iron and the ferric-uptake regulator[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2379.
- [76] DEMIRJIAN C, RAZAVI N, DESAINT H, LONJON F, GENIN S, ROUX F, BERTHOME R, VAILLEAU F. Study of natural diversity in response to a key pathogenicity regulator of *Ralstonia solanacearum* reveals new susceptibility genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(3): 321-338.
- [77] KIM N, KIM JJ, KIM I, MANNAA M, PARK J, KIM J, LEE HH, LEE SB, PARK DS, SUL WJ, SEO YS. Type VI secretion systems of plant-pathogenic *Burkholderia glumae* BGR1 play a functionally distinct role in interspecies interactions and virulence[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(8): 1055-1069.
- [78] KIM N, HAN G, JUNG H, LEE HH, PARK J, SEO YS. T6SS accessory proteins, including DUF2169 domain-containing protein and pentapeptide repeats protein, contribute to bacterial virulence in T6SS group_5 of *Burkholderia glumae* BGR1[J]. *Plants*, 2021, 11(1): 34.
- [79] ASOLKAR T, RAMESH R. The involvement of the type VI secretion system (T6SS) in the virulence of *Ralstonia solanacearum* on brinjal[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(7): 324.
- [80] LIU H, COULTHURST SJ, PRITCHARD L, HEDLEY PE, RAVENSDALE M, HUMPHRIS S, BURR T, TAKLE G, BRURBERG MB, BIRCH PR, SALMOND GP, TOTH IK. Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(6): e1000093.
- [81] TIAN Y, ZHAO Y, WU X, LIU F, HU B, WALCOTT RR. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(1): 38-47.
- [82] MASUM MMI, YANG YZ, LI B, OLAITAN OS, CHEN J, ZHANG Y, FANG YS, QIU W, WANG YL, SUN GC.

- Role of the genes of type VI secretion system in virulence of rice bacterial brown stripe pathogen *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* strain RS-2[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(10): 2024.
- [83] GALLIQUE M, DECOIN V, BARBEY C, ROSAY T, FEUILLOLEY MG, ORANGE N, MERIEAU A. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170770.
- [84] ZHANG LQ, XU JS, XU J, ZHANG H, HE LY, FENG J. TssB is essential for virulence and required for type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2014, 74: 1-7.
- [85] FEI NY, JI WQ, YANG LL, YU CY, QIAO P, YAN JP, GUAN W, YANG YW, ZHAO TC. Hcp of the type VI secretion system (T6SS) in *Acidovorax citrulli* group II strain Aac5 has a dual role as a core structural protein and an effector protein in colonization, growth ability, competition, biofilm formation, and ferric iron absorption[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9632.
- [86] HUG S, LIU YL, HEINIGER B, BAILLY A, AHRENS CH, EBERL L, PESSI G. Differential expression of *Paraburkholderia phymatum* type VI secretion systems (T6SS) suggests a role of T6SS-b in early symbiotic interaction[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 699590.
- [87] LUCERO CT, LORDA GS, LUDUEÑA LM, NIEVAS F, BOGINO PC, ANGELINI J, AMBROSINO ML, TAURIAN T. Participation of type VI secretion system in plant colonization of phosphate solubilizing bacteria[J]. *Rhizosphere*, 2022, 24: 100582.
- [88] SHIDORE T, DINSE T, OHRLEIN J, BECKER A, REINHOLD-HUREK B. Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(10): 2775-2787.
- [89] MOSQUITO S, BERTANI I, LICASTRO D, COMPANT S, MYERS MP, HINAREJOS E, LEVY A, VENTURI V. In planta colonization and role of T6SS in two rice *Kosakonia* endophytes[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2020, 33(2): 349-363.
- [90] SALINERO-LANZAROTE A, PACHECO-MORENO A, DOMINGO-SERRANO L, DURÁN D, ORMEÑO-ORRILLO E, MARTÍNEZ-ROMERO E, ALBAREDA M, PALACIOS JM, REY L. The type VI secretion system of *Rhizobium etli* Mim1 has a positive effect in symbiosis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(5): fiz054.
- [91] TIGHILT L, BOULILA F, de SOUSA BFS, GIRAUD E, RUIZ-ARGUESO T, PALACIOS JM, IMPERIAL J, REY L. The *Bradyrhizobium* sp. LmicA16 type VI secretion system is required for efficient nodulation of *Lupinus* spp.[J]. *Microbial Ecology*, 2022, 84(3): 844-855.
- [92] HOPF V, GOHLER A, ESKE-POGODDA K, BAST A, STEINMETZ I, BREITBACH K. *BPSS1504*, a cluster 1 type VI secretion gene, is involved in intracellular survival and virulence of *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(5): 2006-2015.
- [93] JANI AJ, COTTER PA. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore[J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 8(1): 2-6.
- [94] MATTINEN L, SOMERVUO P, NYKYRI J, NISSINEN R, KOUVONEN P, CORTHALS G, AUVINEN P, AITTAMAA M, VALKONEN JPT, PIRHONEN M. Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 8): 2387-2396.
- [95] YIN R, CHENG JL, WANG JY, LI PX, LIN JS. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: challenges and strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 955286.
- [96] GANNON JT, MANILAL VB, ALEXANDER M. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(1): 190-193.
- [97] 牟嘉仪, 胡晓梦, 彭莉华, 竹攸汀, 梁箫, 杨金龙. 细菌运动性对生物被膜的动态演替及其对厚壳贻贝附着的影响[J]. *渔业科学进展*, 2022, 43: 1-10.
- MU JY, HU XM, PENG LH, ZHU YT, LIANG X, YANG JL. Effects of bacterial motility on dynamic succession of biofilms and settlement of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43: 1-10 (in Chinese).
- [98] PAN P, WANG XL, CHEN Y, CHEN Q, YANG YX, WEI CX, CHENG TT, WAN HT, YU DJ. Effect of Hcp iron ion regulation on the interaction between *Acinetobacter baumannii* with human pulmonary alveolar epithelial cells and biofilm formation[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 761604.
- [99] ZHANG Y, XU YH, HUANG Y. Virulence genotype and correlation of clinical severeness with presence of the type VI secretion system in *Klebsiella pneumoniae* isolates

- causing bloodstream infections[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2022, 15: 1487-1497.
- [100] LIN JS, CHENG JL, CHEN KQ, GUO CH, ZHANG WP, YANG X, DING W, MA L, WANG Y, SHEN XH. The *icmF3* locus is involved in multiple adaptation-and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 70.
- [101] de PACE F, BOLDRIN de PAIVA J, NAKAZATO G, LANCELLOTTI M, SIRCILI MP, GUEDES STEHLING E, DIAS da SILVEIRA W, SPERANDIO V. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain[J]. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 10): 2954-2962.
- [102] TESCHLER JK, JIMÉNEZ-SIEBERT E, JECKEL H, SINGH PK, PARK JH, PUKATZKI S, NADELL CD, DRESCHER K, YILDIZ FH. VxB influences antagonism within biofilms by controlling competition through extracellular matrix production and type 6 secretion[J]. *mBio*, 2022, 13(4): e0188522.
- [103] BATISTA BD, BONATELLI ML, QUECINE MC. Fast screening of bacteria for plant growth promoting traits[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2232: 61-75.
- [104] JI C, TIAN HM, WANG XH, SONG X, JU RC, LI HY, GAO QX, LI CH, ZHANG PC, LI JT, HAO LP, WANG CD, ZHOU YY, XU RP, LIU Y, DU JF, LIU XL. *Bacillus subtilis* HG-15, a halotolerant rhizoplane bacterium, promotes growth and salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. *Biomed Research International*, 2022, 2022: 9506227.
- [105] BASILE LA, LEPEK VC. Legume-rhizobium dance: an agricultural tool that could be improved?[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(5): 1897-1917.
- [106] LIN HH, HUANG HM, YU M, LAI EM, CHIEN HL, LIU CT. Functional exploration of the bacterial type VI secretion system in mutualism: *Azorhizobium caulinodans* ORS571-*Sesbania rostrata* as a research model[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2018, 31(8): 856-867.
- [107] NANJANI S, SONI R, PAUL D, KEHARIA H. Genome analysis uncovers the prolific antagonistic and plant growth-promoting potential of endophyte *Bacillus velezensis* K1[J]. *Gene*, 2022, 836: 146671.
- [108] REGAILO A, DOMINELLI N, ANDRESEN K, HEERMANN R. The biocontrol agent and insect pathogen *Photorhabdus luminescens* interacts with plant roots[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(17): 146671.
- [109] ZHANG DX, YAN M, NIU Y, LIU XY, van ZWIETEN L, CHEN D, BIAN RJ, CHENG K, LI LQ, JOSEPH S, ZHENG JW, ZHANG XH, ZHENG JF, CROWLEY D, FILLEY TR, PAN GX. Is current biochar research addressing global soil constraints for sustainable agriculture?[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2016, 226: 25-32.
- [110] SMITH WPJ, VETTIGER A, WINTER J, RYSER T, COMSTOCK LE, BASLER M, FOSTER KR. The evolution of the type VI secretion system as a disintegration weapon[J]. *PLoS Biology*, 2020, 18(5): e3000720.
- [111] LOPER JE, HASSAN KA, MAVRODI DV, DAVIS EW 2ND, LIM CK, SHAFFER BT, ELBOURNE LD, STOCKWELL VO, HARTNEY SL, BREAKWELL K, HENKELS MD, TETU SG, RANGEL LI, KIDARSA TA, WILSON NL, van de MORTEL JE, SONG C, BLUMHAGEN R, RADUNE D, HOSTETLER JB, et al. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions[J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(7): e1002784.
- [112] VACHERON J, PECHY-TARR M, BROCHET S, HEIMAN CM, STOJILJKOVIC M, MAURHOFER M, KEEL C. T6SS contributes to gut microbiome invasion and killing of an herbivorous pest insect by plant-beneficial *Pseudomonas protegens*[J]. *ISME Journal*, 2019, 13(5): 1318-1329.
- [113] MARCHI M, BOUTIN M, GAZENGEL K, RISPE C, GAUTHIER JP, GUILLERM-ERCKELBOUDT AY, LEBRETON L, BARRET M, DAVAL S, SARNIGUET A. Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(3): 393-403.
- [114] ABO-ELYOUSR KAM, ABDEL-RAHIM IR, ALMASOUDI NM, ALGHAMDI SA. Native endophytic *Pseudomonas putida* as a biocontrol agent against common bean rust caused by *Uromyces appendiculatus*[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(9): 754.
- [115] GU Q, QIAO JQ, WANG RY, LU J, WANG ZQ, LI PP, ZHANG LL, ALI Q, KHAN AR, GAO XW, WU HJ. The role of pyoluteorin from *Pseudomonas protegens* Pf-5 in suppressing the growth and pathogenicity of *Pantoea ananatis* on maize[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 146671.
- [116] AL-KARABLIEH N, AL-SHOMALI I, AL-ELAUMI L,

- HASAN K. *Pseudomonas fluorescens* NK4 siderophore promotes plant growth and biocontrol in cucumber[J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 133(3): 1414-1421.
- [117] GE XC, WEI W, LI G, SUN MM, LI HX, WU J, HU F. Isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain VIH2 and antagonistic properties against *Ralstonia solanacearum*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 519-526.
- [118] DECOIN V, BARBEY C, BERGEAU D, LATOUR X, FEUILLOLEY MG, ORANGE N, MERIEAU A. A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89411.
- [119] KHAN MS, GAO JL, ZHANG MF, XUE J, ZHANG XH. *Pseudomonas aeruginosa* LD-08 isolated from *Lilium davidii* exhibits antifungal and growth-promoting properties[J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269640.
- [120] BORRERO de ACUNA JM, BERNAL P. Plant holobiont interactions mediated by the type VI secretion system and the membrane vesicles: promising tools for a greener agriculture[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(4): 1830-1836.
- [121] LOGAN SL, THOMAS J, YAN JY, BAKER RP, SHIELDS DS, XAVIER JB, HAMMER BK, PARTHASARATHY R. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system can modulate host intestinal mechanics to displace gut bacterial symbionts[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(16): E3779-E3787.
- [122] FAST D, KOSTIUK B, FOLEY E, PUKATZKI S. Commensal pathogen competition impacts host viability[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(27): 7099-7104.
- [123] AMAYA FA, BLONDEL CJ, BARROS-INFANTE MF, RIVERA D, MORENO-SWITT AI, SANTIVIAGO CA, PEZOA D. Identification of type VI secretion systems effector proteins that contribute to interbacterial competition in *Salmonella dublin*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 811932.