

A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction

Un nuevo enfoque molecular en el estudio de la interacción parásito-hospedero

Roberto Padilla-Ramos, UAZ-Unidad Académica de Ciencias Biológicas; **Silvia Salas-Muñoz**, CONACYT-INIFAP, Km. 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo CP 98500. México; **Rodolfo Velásquez-Valle**, **Luis Roberto Reveles-Torres***, INIFAP-Campo Experimental Zacatecas, km 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo CP 98500. México. *Autor para correspondencia: reveles.roberto@inifap.gob.mx

Recibido: 04 de Septiembre, 2018.

Aceptado: 26 de Octubre, 2018.

Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R and Reveles-Torres LR. 2018. A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1808-6

Primera publicación DOI: 17 de Noviembre, 2018.

First DOI publication: November 17, 2018.

Resumen. Los efectores, se han convertido en el eje fundamental de las investigaciones relacionadas a la interacción de los parásitos y sus hospederos, la manera en como regulan a nivel molecular los procesos de infección, y la forma en cómo estas moléculas han evolucionado, parecen ser las cuestiones más importantes que se tendrán que abordar en los siguientes años. Estas nuevas líneas de investigación, quedarán supeditadas al enorme progreso que tendrán la siguiente generación de tecnologías de secuenciación, y con ellas un cambio de paradigma en nuestra visión de los sistemas complejos. Sin embargo, aún quedan muchas cuestiones por dilucidar acerca de los efectores, por ejemplo,

Abstract. Effectors have become the cornerstone of all investigations related to the interaction of parasites and their hosts, how they regulate the processes of infection at a molecular level, and how these molecules have evolved seem to be the most important issues that will have to be addressed in the following years. These new lines of research will be subject to the enormous progress that the next generation of sequencing technologies will have, and with them a paradigm shift in our vision of complex systems. However, there remain many questions to be elucidated about effectors, for example, how these proteins interact spatially and temporally in their hosts, possible co-operation between effectors, and the existence of protein complexes within host cells. This leads to the following questions: Do the effectors have the capacity for phenotypic expression beyond the genes that encode them? And above all, why are these proteins so widespread on a huge range of evolutionarily distant pathogens?

Key words: coevolution, virulence, parasitism.

la manera en como estas proteínas interactúan de forma espacial y temporal en sus anfitriones, la posible cooperación entre los efectores, y la existencia de complejos proteicos dentro de las células huésped. De ello surgen las siguientes preguntas: ¿Los efectores tienen la capacidad de expresión fenotípica más allá de los genes que los codifican?, y sobre todo ¿Por qué estas proteínas se encuentran tan extendidas sobre una enorme gama de patógenos evolutivamente distantes?

Palabras clave: coevolución, virulencia, parasitismo

Los parásitos interaccionan con sus huéspedes por medio de proteínas especiales, las cuales tienen efectos tanto en las células donde inciden como en los fenotipos de sus huéspedes. Los estudios de la interacción entre estas proteínas y el proceso de patogénesis se encuentran en rápido crecimiento dentro de la fitopatología en general, esto nos obliga a mantener actualizado el conocimiento de este enfoque emergente.

Relación parásito- hospedero. Cuando hablamos de la relación hospedero-parásito estamos tratando un tipo de asociación de dos protagonistas que desempeñan funciones activas y fundamentales. Sabemos que el parásito depende metabólica y evolutivamente del hospedero; entre ellos se establece contacto biológico e intercambio molecular, donde se crea una relación mutua entre la defensa del hospedero y el ataque del parásito. Entre esta lucha armamentista, un éxito de los parásitos es la modulación que producen sus “efectores” sobre las defensas del hospedero; mediante el que, de forma potencial, ocasiona acciones patógenas o modificaciones del equilibrio homeostático del hospedero y de la respuesta adaptativa de su sistema inmune.

Parasites interact with their hosts through special proteins that have effects both on the cells they invade and on the host’s phenotype. Studies of the interaction between these proteins and the pathogenetic process are rapidly increasing within phytopathology in general and, therefore, we must keep our knowledge of this emerging approach up to date.

Parasite-host relationship. When referring to a host-parasite relationship, we mean a type of association between two players that perform active and essential roles. We know that a parasite depends metabolically and evolutionarily on its host, because they establish biological contact and molecular exchange to create a mutual relationship between the host’s defense and the parasite’s attack. In this arms race, parasites succeed because of the modulation produced by their “effectors” on the host’s defenses, potentially causing pathogenic actions or changes to the host’s homeostatic balance and adaptive response of its immune system.

Plant parasites and pathogens reprogram the host’s development and morphology (Le Fevre *et al.*, 2015), and in this way the effector proteins of certain bacteria, such as phytoplasmas, modify the ecosystem architecture (Tomkins *et al.*, 2018). Phytoplasmas cause phyllody in the host plants, supposedly to attract the insect vectors on which these bacteria’s transmission depends. Phytoplasma effectors in insects such as SAP54 improve their capacity to infect plants, and pathogens have a competitive advantage because their life cycle is extended (Sugio *et al.*, 2011). Certain effectors, identified as PexRD54 for the first time in *Phytophthora infestans*, cause cell death in plant tissue of *Nicotiana benthamiana* (Białas *et al.*, 2017) when the effectors are overexpressed as mature proteins. These are only some examples of the multiple studies that have revealed the

Los parásitos y patógenos de las plantas reprograman el desarrollo y morfología del hospedero (Le Fevre *et al.*, 2015), y con esto las proteínas efectoras de ciertas bacterias como los fitoplasmas modifican la arquitectura del ecosistema (Tomkins *et al.*, 2018). Los fitoplasmas inducen filodia en sus plantas hospederas, presumiblemente para atraer insectos vectores de los que dependen estas bacterias para su transmisión. Los efectores de fitoplasmas en insectos como (SAP54), mejoran la aptitud de éstos para que tengan mayor capacidad de infectar plantas, teniendo los patógenos una ventaja competitiva al extender su tiempo de vida (Sugio *et al.*, 2011). Ciertos efectores identificados por primera vez en *Phytophthora infestans* como *PexRD54*, activan la muerte celular del tejido vegetal de *Nicotiana benthamiana* (Białas *et al.*, 2017) cuando se sobreexpresan como proteínas maduras. Estos son solo algunos ejemplos de múltiples estudios que han podido revelar el funcionamiento molecular de los efectores como moduladores del metabolismo y de la expresión génica del hospedero. Otro sistema molecular que se ha vuelto un objetivo común de los parásitos, es el sistema de ubiquitinación, un sistema de regulación génica postraduccional, que en este caso es utilizado por éstos para degradar la inmunidad del hospedero, y así alterar la fisiología celular en beneficio del parásito invasor. La ubiquitina es una proteína pequeña que se une covalentemente a los residuos de lisina de otra proteína con la cual queda esta “marcada” para ser degradada por vía del proteosoma 26S. Ciertos patógenos han evolucionado para identificar y explotar las debilidades en este sistema, proporcionando una mayor capacidad patogénica al afectar las vías de ubiquitina en las plantas (Banfield, 2015).

La resistencia de los hospederos a las enfermedades dependerá de la interacción específica de los genes de resistencia (*R*) con los correspondientes genes de avirulencia (*Avr*). Se ha sugerido que los

molecular function of effectors as modulators of the host's metabolism and gene expression. Another molecular system that has become a common target of parasites is the ubiquitination system, a post-translational gene regulation system which, in this case, is used by parasites to degrade the host's immunity and alter its cell physiology, which benefits the invading parasite. Ubiquitin is a small protein that covalently binds to the lysine residues of other proteins, thereby “marking” them for degradation via the 26S proteasome. Certain pathogens have evolved to identify and exploit the weaknesses of this system and this has led to a greater pathogenic capacity to affect ubiquitin pathways in plants (Banfield, 2015).

Host resistance to diseases depends on the specific interaction between the resistance genes (*R*) and the corresponding avirulence genes (*Avr*). It has been suggested that the *R* genes encode for receptors that interact with ligands for the corresponding avirulence genes (De la Concepcion *et al.*, 2018). Some host genes encode for effector protein recognition, such as the *Solanum pimpinellifolium* and *Nicotiana paniculata* *MEcp2* gene that identifies the *Ecp2* effector of parasitic fungi of the Capnodiales class (*Cladosporium fulvum*) (Dagdas *et al.*, 2016). It also seems that the phyllody (leaf-shaped flowers) produced by effector proteins (effector SAP54) on phytoplasmas is genetically related to a strong preference for insect-egg laying on plants infected by these bacteria. These facts lead us to believe that the changes in morphology are adaptive and that the parasite and host genomes will be jointly selected by evolution (Amselem *et al.*, 2015). Other avirulence genes (such as *AvrK1* and *Avr10*) encode for effector proteins in the fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*), which increase their pathogenicity in barley plants (Di *et al.*, 2017). Studies of rust fungi that affect many economically

genes *R* codifican para receptores que interactúan con ligandos para los correspondientes genes de avirulencia (De la Concepcion *et al.*, 2018). Algunos genes en los hospederos codifican para el reconocimiento de proteínas efectoras como el gen *MEcp2* de *Solanum pimpinellifolium* y *Nicotiana paniculata* que identifica al efector Ecp2 de hongos parásitos de la clase Capnodiales (*Cladosporium fulvum*) (Dagdas *et al.*, 2016). También parece que la filodia (flor en forma de hoja) producida por proteínas efectoras (efector SAP54) en fitoplasmas, esta genéticamente relacionada con una mayor preferencia de puesta de huevos de insectos en las plantas infectadas por estas bacterias. Estos hechos nos hace suponer que los cambios en la morfología son adaptativos, así los genomas de parásitos y hospederos serán seleccionados en conjunto por la evolución (Amselem *et al.*, 2015). Otros genes de avirulencia como *AvrKI* y *Avra10* codifican proteínas efectoras en el hongo *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) que aumentan su patogenicidad en plantas de cebada (Di *et al.*, 2017). Estudios en los hongos de la roya que afectan muchas plantas de importancia económica como el café y la soja, han servido como excelentes modelos para comprender los mecanismos que sustentan la patogénesis, como en el caso del agente patógeno de la roya *Melampsora lini*, cuyos estudios demuestran como las secuencias que codifican los efectores, están conservados en todos los genomas de estas especies para promover la infección (Nemri *et al.*, 2014), lo que nos habla del papel tan importante de los efectores en la interacción parasito-hospedero.

El fenotipo extendido. El concepto de fenotipo extendido (genes cuyos efectos llegan más allá de las células en las que residen) presentado por Richard Dawkins en su libro clásico “El fenotipo extendido” (Dawkins, 2016) resume perfectamente la visión de que los efectores actúan fuera de los parásitos. Los efectores son los productos de los genes

important plants such as coffee and soybean have served as excellent models for understanding the mechanisms that support pathogenesis, such as *Melampsora lini*, a rust pathogen, whose studies have shown how the sequences that encode for effectors are conserved in the genome of all these species and promote infection (Nemri *et al.*, 2014), a fact that highlights the important role effectors play in the parasite-host interaction.

The extended phenotype. The concept of the extended phenotype (genes whose effects go beyond the cells in which they reside), introduced by Richard Dawkins in his classic book *The Extended Phenotype* (Dawkins, 2016), perfectly summarizes the idea that effectors act outside of parasites. Effectors are produced by genes residing in the pathogen’s genome, but they actually act in the interface with the host plant, or even inside the plant cells, providing an example of Dawkin’s extended genotype (Kamoun, 2007). Parasites can infect their hosts and cause severe changes in their appearance and performance, which are usually interpreted as being extended phenotypes that promote the parasite’s survival and ability (Le Fevre *et al.*, 2015).

Some phytoplasmas that infect plants, such as *Candidatus Phytoplasma trifolii*, produce phyllody, supposedly to attract the insect vectors on which these bacteria depend for transmission (MacLean *et al.*, 2014). However, the question remains as to whether plant morphological phenotypes, such as phyllody, directly benefit the vectors or whether they are secondary products of phytoparasitic infections (Hughes *et al.*, 2012) (Figure 1).

MacLean *et al.* (2014) found that the SAP54 effector of phytoplasma induces phyllody in host cells, creating ecological niches to promote the vector’s colonization, and that these modifications in the host can be considered as being an extended phenotype caused by these proteins.

que residen en los genomas de patógenos, pero que en realidad funcionan en la interfaz con la planta huésped o incluso dentro de las células vegetales, proporcionando un ejemplo del fenotipo extendido de Dawkins (Kamoun, 2007). Los parásitos pueden infectar a sus hospederos y desencadenar cambios severos en su apariencia y en el comportamiento que normalmente se interpretan como fenotipos extendidos para promover la supervivencia y la aptitud del parásito (Le Fevre *et al.*, 2015).

Algunos fitoplasmas como *Candidatus Phytoplasma trifolii* que infectan plantas, inducen filodia, presumiblemente para atraer insectos vectores de los que dependen estas bacterias para su transmisión (MacLean *et al.*, 2014). Sin embargo, sigue siendo discutible si los fenotipos morfológicos de los vegetales como la filodia, son directamente beneficiosos para los vectores, o son productos secundarios de la infección por fitoparásitos (Hughes *et al.*, 2012) (Figura 1).

Incidence in the host cell. Many pathogen effectors are extraordinary examples of biological innovation and include some of the most important proteins known to function within plant cells, as shown in the diagram (Figure 2). Some of these effector proteins can even be specifically directed towards defense mechanisms that provide immunity against pathogen virulence genes, such as the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector (Mccann, 2016). Plant bacteria, fungi, oomycetes and nematodes have developed the ability to manage effector proteins within host cells using different mechanisms (Hogenhout *et al.*, 2009).

Biotrophic fungi and oomycetes have developed haustoria to manage effector proteins within the host cell (Whisson *et al.*, 2007). Phytoparasitic nematodes use a specialized feeding organ known as a stylet to inject their effector proteins into a parasitized vascular cell (Davis *et al.*, 2008).



Figura 1. Estructuras florales sanas de *Catharanthus roseus* (A), con filodia y virescencia causada por *Candidatus Phytoplasma trifolii* (B).

Figure 1. (A) Healthy structures of *Catharanthus roseus* flowers, and (B) with phyllody and virescence caused by *Candidatus Phytoplasma trifolii*.

MacLean *et al.* (2014) encontraron que el efector SAP54 de fitoplasma, induce filodia en las células huéspedes creando nichos ecológicos para promover la colonización por el vector, entendiendo estas modificaciones en el huésped como un fenotipo extendido producido por estas proteínas.

Incidencia en la célula huésped. Muchos efectores de patógenos son ejemplos extraordinarios de innovación biológica e incluyen algunas de las proteínas más notables conocidas que funcionan dentro de las células vegetales, tal como se muestra en el diagrama (Figura 2). Algunas de estas proteínas efectoras pueden incluso dirigirse de forma específica a mecanismos de defensa conservados para la inmunidad contra genes de virulencia de patógenos, como el efector Avr2 de *Fusarium oxysporum* (McCann, 2016). Las bacterias, hongos, oomicetos, y nematodos patógenos de las plantas han desarrollado la capacidad de administrar proteínas efectoras dentro de las células huésped a través de una diversidad de mecanismos (Hogenhout *et al.*, 2009).

Los hongos biotróficos y los oomicetos han desarrollado haustorios para administrar proteínas efectoras dentro de la célula huésped (Whisson *et al.*, 2007). En el caso de los nematodos fitoparásitos utilizan un órgano especializado de alimentación conocido como el estilete, para inyectar sus proteínas efectoras dentro de una célula vascular parasitada (Davis *et al.*, 2008).

Algunas proteínas fúngicas, en particular la toxina selectiva ToxA del hospedero de *Pyrenophora tritici-repentis*, no requiere del patógeno para trasladarse dentro de las células vegetales (Sarma *et al.*, 2005). ToxA viaja dentro de las células huésped presumiblemente mediante la designación de un receptor de superficie vegetal que se une a un motivo proteínico conformado por los aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato. Otros efectores pueden suprimir la capacidad de autofagia selectiva en el

Some fungi proteins, particularly the selective toxin ToxA from the *Pyrenophora tritici-repentis* host, do not need the pathogen to move within plant cells (Sarma *et al.*, 2005). ToxA moves within the host cells supposedly by designating a plant area receptor that binds to a protein motif formed by arginine-glycine-aspartate amino acids. Other effectors can suppress the host's selective autophagy—plants use autophagy to protect themselves against pathogens—but how parasites are involved in these cell processes is still not known (Dagdas *et al.*, 2016). One example of autophagy suppression is the PexRD54 effector produced by *Phytophthora infestans*, the causal agent of potato late blight (Washington *et al.*, 2016).

Other effectors act in the apoplast. Some effectors act in the extracellular space of the plant-microbe interface, where they interfere with the plant's apoplastic defenses and facilitate infection (Misas-Villamil and Van der Hoorn, 2008). These examples include the protein effectors secreted by *Cladosporium fulvum* (Cooke), which is an extracellular parasitic fungus found on tomato leaves that only grows in the apoplast and does not form haustorial structures (Thomma *et al.*, 2005). All the known *Cladosporium fulvum* effectors (Avr2, Avr9, Avr4 and ECP2) are proteins rich in cysteine amino acid, which are believed to act exclusively in the apoplast (Thomma *et al.*, 2005). Oomycetes such as *Phytophthora infestans* secrete apoplastic effectors as well as displacement effectors (cytoplasmic) in their hosts (Damasceno *et al.*, 2008).

A common activity attributed to many *Cladosporium fulvum* apoplastic effects, as well as to other fungal pathogens and oomycetes, is the ability to protect themselves against plant hydrolytic enzymes such as proteases, glucanases and chitinases (Misas-Villamil and Van der

hospedero, las plantas usan la autofagia para protegerse contra los patógenos, no obstante aún se desconoce cómo los parásitos interfieren en estos procesos celulares (Dagdas *et al.*, 2016). Un ejemplo de supresión de autofagia es el efector PexRD54 producido por *Phytophthora infestans* que produce la enfermedad de “Tizón tardío de la papa” (Washington *et al.*, 2016).

Hoorn, 2008), which are the host plant's defense mechanisms against exogenous agents such as parasites.

The *C. fulvum* Avr2 effector counteracts defense mechanisms because it is a cysteine-protease inhibitor directed at the Rcr3 and PIP1 tomato apoplastic enzymes, cysteines and proteases (van Esse *et al.*, 2008). *Phytophthora infestans*

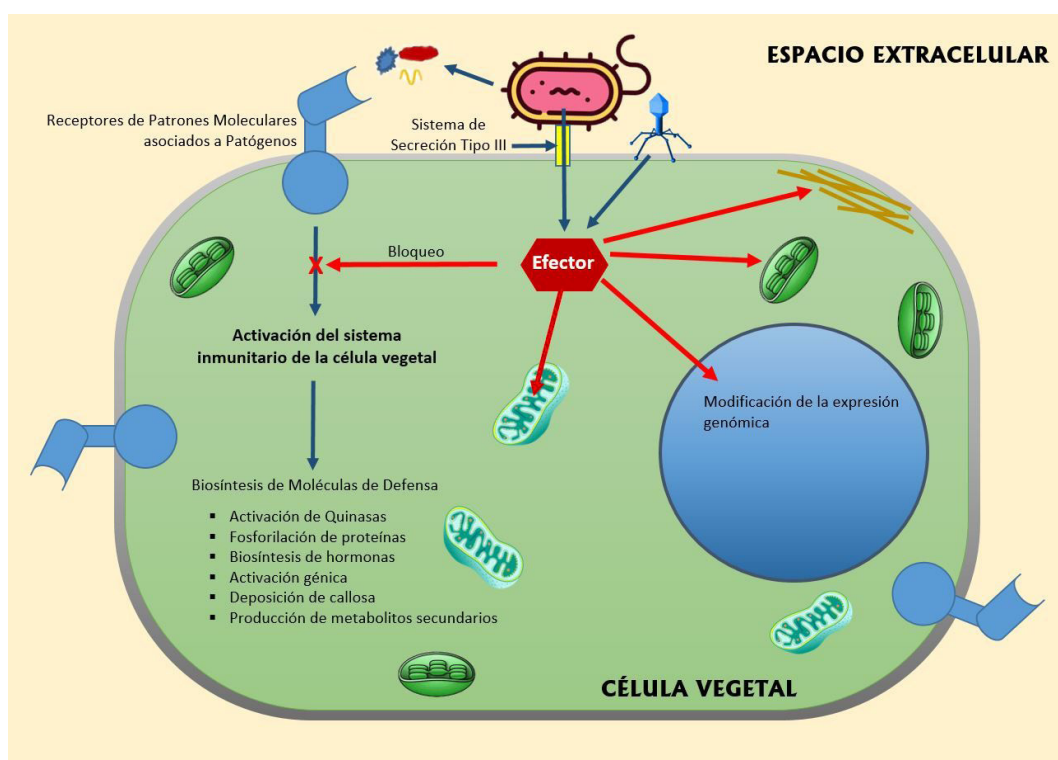


Figura 2. Vías de los efectores secretados por patógenos en el interior de células vegetales de la planta hospedera. Los patógenos pueden inyectar sus efectores a través del Sistema de Secreción tipo III hacia el citoplasma de la célula vegetal. Según el tipo de efector, este puede bloquear la activación del sistema inmune de la célula vegetal, el cual es mediado por los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos. Otro tipo de efectores pueden alterar cloroplastos, mitocondrias o al citoesqueleto de la célula hospedera en favor de la colonización del patógeno. Asimismo, los efectores pueden modificar la expresión genómica para la producción de proteínas que benefician la patogenidad.

Figure 2. Pathways of effectors secreted by pathogens inside the cells of the host plant. Pathogens can inject their effectors into the plant cell cytoplasm through the type III secretion system. Depending on the type of effector, they can block the immune system of the plant cell, which is mediated by the receivers of molecular patterns associated with pathogens. Other types of effectors can alter the chloroplasts, mitochondria and cytoskeleton of the host cell to facilitate pathogen colonization. Effectors are also able to modify genomic expression to produce proteins that benefit pathogenicity.

Otros efectores actúan en el apoplasto. Algunos efectores actúan en el espacio extracelular en la interface planta-microbio, donde interfieren con las defensas apoplásticas de la planta para infectarla (Misas-Villamil y Van der Hoorn, 2008). Los ejemplos incluyen los efectores proteicos secretados por *Cladosporium fulvum* (Cooke); este hongo es un parásito extracelular de hojas de tomate que crece exclusivamente en el apoplasto y no forma estructuras haustorias (Thomma *et al.*, 2005). Todos los efectores conocidos de *Cladosporium fulvum*, tales como Avr2, Avr9, Avr4 y ECP2, son proteínas ricas en el aminoácido cisteína, que se cree que funcionan exclusivamente en el apoplasto (Thomma *et al.*, 2005). Los oomicetos, tales como *Phytophthora infestans* segregan efectores apoplásticos además de efectores de desplazamiento (citoplásmicos) en sus hospedadores (Damasceno *et al.*, 2008).

Una actividad común atribuida a muchos efectores apoplásticos de *Cladosporium fulvum* y otros patógenos fúngicos y de oomicetos es su capacidad para protegerse contra enzimas hidrolíticas de plantas, tales como proteasas, glucanasas y quitinasas (Misas-Villamil y Van der Hoorn, 2008), las cuales son mecanismos de defensa de la planta hospedera contra agentes exógenos tales como los parásitos.

El efector Avr2 de *C. fulvum* contrarresta los mecanismos de defensa, ya que es un inhibidor de cisteína-proteasa dirigido a las enzimas cisteínas proteasas apoplásticas Rcr3 y PIP1 de tomate (van Esse *et al.*, 2008). *Phytophthora infestans* también secreta inhibidores de cisteína proteasa, tales como EPIC2B, que inhibe a la enzima PIP1 y otras proteasas apoplásticas de tomate (Tian *et al.*, 2007). Además, produce los efectores EPI1 y EPI10, que son inhibidores de la enzima serina-proteasa que se une e inhibe la proteína P69B relacionada con la patogénesis de *Phytophthora infestans*. Esta serina-proteasa es similar a la subtilisina del tomate que se cree funciona en mecanismos de defensa

also secretes protease-cysteine inhibitors, such as EPIC2B, which inhibits the PIP1 enzyme and other tomato apoplastic proteases (Tian *et al.*, 2007). It also produces EPI1 and EPI10 effectors, which are serine-protease enzyme inhibitors that bind to and inhibit the P69B protein that is related to *Phytophthora infestans* pathogenesis. This serine-protease is similar to tomato subtilisin which is believed to act in defense mechanisms against pathogens (Tian *et al.*, 2005). The genus *Phytophthora* spp. is also known to secrete glucanase inhibitors that inhibit the host's apoplastic enzyme endo- β -1,3 glucanase (Damasceno *et al.*, 2008).

Multiple targets in the cells of the host. Van der Hoorn and Kamoun defined operational targets as those host targets which, when manipulated by effectors, result in an altered defense or susceptible state. Therefore, it is important to distinguish operational targets from other types of host targets. These principles led to the idea that some decoy proteins of the host are not operational targets but that when disrupted by the effectors, they result in the host being recognized by the effector's similar R proteins (van der Hoorn and Kamoun, 2008). The *Pseudomonas syringae* (Hall) AvrRpt2 protein is an effector of the T3SS type, which is a system that forms multiproteic complexes that prevent the presence of the effector in the extracellular medium; as a result, substrates are secreted by the plant cytoplasm into the extracellular medium with proteolytic activity against at least five *Arabidopsis* proteins, including the negative defense regulator RIN4_ (Chisholm *et al.*, 2006). AvrPto, another *Pseudomonas syringae* T3SS effector, is a kinase inhibitor that disables tomato Pto kinase (Xing *et al.*, 2007). Other examples of multiple targets include Avr2 and EPIC2B protease inhibitors, which inhibit several tomato apoplastic proteases (van Esse *et al.*, 2008).

contra patógenos (Tian *et al.*, 2005). El género *Phytophthora* spp es también conocido por secretar inhibidores de glucanasa que inhiben la enzima apoplásica del hospedero endo- β -1,3 glucanasa (Damasceno *et al.*, 2008).

Objetivos múltiples en las células del hospedero.

Van der Hoorn y Kamoun definieron los objetivos operativos como aquellos objetivos del hospedero que, cuando son manipulados por los efectores, resultan en un estado alterado de defensa o susceptibilidad. Por lo tanto, es importante distinguir los objetivos operativos de otros tipos de objetivos del hospedero. Estos principios condujeron al concepto de que algunas proteínas señuelo del hospedero, no son objetivos operativos, pero que, cuando son perturbadas por los efectores, desencadenan el reconocimiento del hospedero por las proteínas R afines del efector (van der Hoorn y Kamoun, 2008). La proteína AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* (Hall) es un efector del tipo T3SS, el cual es un sistema que forma complejos multiproteicos que evitan la presencia del efector en el medio extracelular, por lo que los sustratos son secretados desde el citoplasma vegetal hasta el medio extracelular, con actividad proteolítica contra al menos cinco proteínas de *Arabidopsis*, incluyendo el regulador de defensa negativo RIN4 (Chisholm *et al.*, 2006). AvrPto, otro efector de T3SS de *Pseudomonas syringae*, es un inhibidor de quinasa que inhabilita la quinasa Pto de tomate (Xing *et al.*, 2007). Otros ejemplos de objetivos múltiples incluyen los inhibidores de proteasa Avr2 y EPIC2B, los cuales inhiben varias proteasas apoplásicas de tomate (van Esse *et al.*, 2008).

Cada interacción de un efector y una proteína del hospedero pueden ser benéficas para el patógeno, tener consecuencias negativas o tener efectos neutrales en la interacción entre el patógeno y la planta (**Cuadro 1**).

Each interaction between an effector and a host protein can benefit the pathogen and have negative consequences or neutral effects on the pathogen-plant interaction (Table 1).

Molecular mimicry. Effectors produce analogous and imitators of plant hormones (Hogenhout *et al.*, 2009). An example of this is coronatine, a toxin secreted by several repetitive genes of the *Pseudomonas syringae* genome, which is a structural and functional imitator of the jasmonoyl-isoleucine (JA-ile) vegetal hormone (Bender *et al.*, 1999). Coronatine has effects that improve plant bacterial colonization. Its effects include phytohormone saturation, which stops inducing the salicylic acid-mediated resistance response, and causes the plants' stomata to open more, which in turn increases host infection. Other classic cases of hormone mimicry in plant pathogens include auxins and cytokinesins produced by different bacteria, such as *Agrobacterium* (Costacurta and Vanderleyden, 1995). There are also modified cytokinins produced by *Rhodococcus fascians* (Tilford) and *Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima) fas operons (Hogenhout and Loria, 2008), and altered gibberellins produced by several fungi (Kawaide, 2006), such as *Gibberella fujikuroi*, a pathogen that affects rice seedlings (Tudzynski, 1999).

Besides hormone mimicry, effectors also include several surprising examples of molecular mimicry. The C-terminal region of the AvrPtoB effector of *Pseudomonas syringae* was found to be a structural and functional imitator of E3 ubiquitin-ligases in eukaryotes (Janjusevic *et al.*, 2006). Degradation mediated by AvrPtoB of Fen kinase of the target host depends on the activity of the E3 ubiquitin ligase of AvrPto (Rosebrock *et al.*, 2007).

Another example of molecular mimicry is the *Xanthomonas vesicatoria* Type III AvrBs3 effector

Cuadro 1. Proteínas efectoras que se reportan en estudios de interacción entre patógenos y plantas hospederas.
Table 1. Effector proteins reported in previous studies of pathogen-host plant interaction.

Organismo	Efector (proteína)	Función en el hospedero (Objetivos operativos)	Referencia
<i>Cladosporium fulvum</i> (hongo)	Ecp2	Reconocimiento de secuencias específicas	(Dagdas <i>et al.</i> , 2016)
<i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> (Bacteria)	SAP54	Cambios en la morfología de la planta, inducen fenotipos adaptativos para los vectores (filodia).	(Amselem <i>et al.</i> , 2015)
<i>Blumeria graminis f.sp</i> (hongo)	AvrK1 y AvrA10	Codifican proteínas que aumentan su patogenicidad en plantas de cebada.	(Di <i>et al.</i> , 2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Avr2	Interfieren de forma específica a mecanismos de defensa conservado para la inmunidad contra genes de virulencia de patógenos.	(McCann, 2016)
<i>Phytophthora infestans</i>	PexRD54	Suprime la capacidad de autofagia selectiva en el huésped, las plantas usan la autofagia para protegerse contra los patógenos.	(Washington <i>et al.</i> , 2016)
<i>Cladosporium fulvum</i> (hongo)	Avr2, Avr9, Avr4 y ECP2	Actúan en el espacio extracelular en la interface planta-microbio, donde interfieren con las defensas apoplásticas de la planta para infectarla.	(Thomma <i>et al.</i> , 2005)
<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrRpt2	Actividad proteolítica contra al menos cinco proteínas de <i>Arabidopsis</i> , incluyendo el regulador de defensa negativo RIN4.	(Chisholm <i>et al.</i> , 2006)
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	AvrBs3	Actúa como un activador transcripcional, uniéndose a una secuencia promotora.	(Römer <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopAF1	Suprime la inmunidad de la planta, este efector se encuentra en los genomas de muchas bacterias de este tipo y posiblemente esté relacionado con la proteína deamidasa.	(Hughes y Banfield, 2014)
<i>Orden Tylenchida</i> (nematodos)		Reprograman el desarrollo y la inmunidad en la planta.	(Lilley <i>et al.</i> , 2018)
<i>Phytophthora sojae</i>	Avr1b	Suprime la muerte celular programada.	(Dou <i>et al.</i> , 2008)
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	AvrBs3	Hipertrofia celular. Se cree que estas lesiones cancerosas facilitan la liberación bacteriana del tejido infectado y aumentan su diseminación.	(Kay <i>et al.</i> , 2007)

Mimetismo molecular. Los efectores producen análogos e imitadores de hormonas vegetales (Hogenhout *et al.*, 2009). Un ejemplo es la coronatina, una toxina secretada por varios genes repetitivos del genoma de *Pseudomonas syringae*, esta toxina es un imitador estructural y funcional de la hormona vegetal jasmonoil-isoleucina (JA-ile) (Bender *et al.*, 1999). La coronatina tiene efectos que mejoran la colonización bacteriana de las plantas. Estos incluyen la saturación de fitohormonas, conduce al cese de la inducción en la respuesta de resistencia mediada por ácido salicílico, lo que provoca el au-

which travels to the cell nucleus, where it acts as a transcriptional activator and binds to a conserved sequence promoter of the *Xanthomonas vesicatoria* genome, called upa box (Römer *et al.*, 2007). Given that this box is also conserved in different genes of the pepper genome (*Piper nigrum*), it is believed that AvrBs3 imitates one of the host's transcription factors (not yet discovered), which also points to this promotor sequence. Results of several studies have revealed that phytoparasitic nematodes secrete a series of proteins that imitate plant effectors, which allows the expression of

mento de la apertura de los estomas de las plantas, lo que provoca un incremento de la infección del hospedero. Otros casos clásicos de mimetismo de fitohormonas en patógenos de plantas, incluyen auxinas y citoquinas producidas por diversas bacterias, incluyendo a *Agrobacterium* (Costacurta y Vanderleyden, 1995). Igualmente existen citoquinas modificadas producidas por los operones *fas* de *Rhodococcus fascians* (Tilford) y *Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima) (Hogenhout y Loria, 2008), y giberelinas alteradas producidas por varios hongos (Kawaide, 2006) tales como *Gibberella fujikuroi*, patógeno de plántulas del arroz (Tudzynski, 1999).

Además del mimetismo hormonal, los efectores representan también varios ejemplos sorprendentes de mimetismo molecular. La región C-terminal del efector AvrPtoB de *Pseudomonas syringae*, resultó ser un imitador estructural y funcional de ubiquitina-ligasas E3 en eucariotas (Janjusevic *et al.*, 2006). La degradación mediada por AvrPtoB de la quinasa Fen del hospedero objetivo depende de la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 de AvrPto (Rosebrock *et al.*, 2007).

Otra demostración de mimetismo molecular es el efector AvrBs3 de tipo III de *Xanthomonas vesicatoria* el cual viaja al núcleo de la célula, donde actúa como un activador transcripcional, uniéndose a una secuencia promotora conservada del genoma de *Xanthomonas vesicatoria* llamada la caja *upa* (Römer *et al.*, 2007). Debido a que esta caja se conserva en varios genes también del genoma de la pimienta (*Piper nigrum*), se cree que el AvrBs3 imita un factor de transcripción del hospedero aún no descubierto, que también apunta a esta secuencia promotora. Los trabajos de varias investigaciones han revelado que los nematodos fitoparásitos secretan una batería de proteínas que imitan a efectores vegetales, lo que permite expresar genes vegetales que ayudan a la colonización del patógeno (Cai *et al.*, 2008).

plant genes that favor colonization by the pathogen (Cai *et al.*, 2008).

Suppressing plant immunity. Suppression of a plant's innate immunity has emerged as the primary function of effectors, particularly of T3SS effectors of plant pathogenic bacteria (Zhou and Chai, 2008). Some effectors, such as *Pseudomonas syringae* HopAF1, suppress a plant's immunity; this effector is found in the genomes of many bacteria of this type and may be related to the deamidase protein, since deamidation is the irreversible substitution of an amide group by a carboxylate group (Hughes and Banfield, 2014). The *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) pathogen translocates effector proteins to suppress host plant immunity (Wirthmueller *et al.*, 2018). The way in which these effectors act to produce virulence is by suppressing the basal defense of the host plant's immune system by not recognizing the molecular pattern associated with pathogens (known as PAMPs), which is one of the defense systems of plant cells (Kim *et al.*, 2005). Some species of plant parasitic nematodes of the *Tylenchida* order secrete effector proteins into their hosts during the infection process in order to reprogram the plant's development and immunity (Lilley *et al.*, 2018).

Other T3SS effectors of phytopathogenic bacteria suppress hypersensitive cell death caused by several Avr proteins, a fact that in some cases explains previous observations of epistatic interactions among Avr genes (Abramovitch *et al.*, 2006). The T3SS effectors are directed towards three plant processes that are essential for innate immunity, i.e., protein rotation, RNA homeostasis and phosphorylation pathways (Block *et al.*, 2008).

Some fungi and oomycetes produce effectors that suppress cell death (Panstruga, 2003). This is based on histological observations of susceptible interactions and the prevalence of cell death suppressors among the T3SS bacterial effectors

Supresión de la inmunidad en las plantas. La supresión de la inmunidad innata de la planta ha surgido como la función primaria de los efectores, particularmente de los efectores T3SS de las bacterias patógenas de las plantas (Zhou y Chai, 2008). Algunos efectores como HopAF1 de *Pseudomonas syringae* suprime la inmunidad de la planta, este efector se encuentra en los genomas de muchas bacterias de este tipo y posiblemente esté relacionado con la proteína deamidasa, la desamidación es la sustitución irreversible de un grupo amida con un grupo carboxilo (Hughes y Banfield, 2014). El patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa) trasloca proteínas efectoras para suprimir la inmunidad de la planta huésped (Wirthmueller *et al.*, 2018). La forma de acción de estos efectores para provocar la virulencia, es suprimiendo la defensa basal del sistema inmunitario del hospedero vegetal, a través del no reconocimiento del patrón molecular asociado a patógenos (llamado PAMPs), que las células vegetales tienen como uno de los sistemas de defensa (Kim *et al.*, 2005). Algunas especies de nematodos parásitos de plantas dentro del orden *Tylenchida* secretan proteínas efectoras en sus hospederos en el proceso de infección para reprogramar el desarrollo y la inmunidad de la planta (Lilley *et al.*, 2018).

Otros efectores T3SS de las bacterias fitopatógenas suprimen la muerte celular hipersensible provocada por varias proteínas Avr, explicando en algunos casos, observaciones anteriores de las interacciones epistáticas entre los genes Avr (Abramovitch *et al.*, 2006). Los efectores T3SS se dirigen a tres procesos vegetales que son claves para la inmunidad innata a saber, la rotación proteica, homeostasis de ARN y vías de fosforilación (Block *et al.*, 2008).

Algunos hongos y oomicetos producen efectores que suprimen la muerte celular (Panstruga, 2003). Lo anterior se encuentra basado en observaciones

(Janjusevic *et al.*, 2006). The *Phytophthora infestans* Avr3a effector suppresses hypersensitive cell death caused by another *Phytophthora infestans* protein (INF1 elicitor), which suggests a possible virulence function (Bos *et al.*, 2006).

Another type of effectors is the RXLR type, which are characterized by having a domain with RXLR amino acids (Arginine-Leucine-Arginine) within their protein structure at the C-terminal end. The *Phytophthora sojae* effector of the RXLR type also suppresses programmed cell death caused by the BAX mouse protein in yeast and plants (Dou *et al.*, 2008). Sohn (2007) demonstrated that administering *Hyaloperonospora parasitica* (Pers) ATR1 and ATR13 effectors increases *Pseudomonas syringae* virulence. ATR13 also suppresses the deposition of unchained callose by *Pseudomonas syringae*, which suggests that its action affects the basal defenses against pathogens (Sohn *et al.*, 2007). These findings indicate that, like the bacterial T3SS effectors, the oomycetes RXLR effectors often act as plant immunity suppressors. However, the mechanisms through which the RXLR effectors interfere with immunity have not yet been correctly elucidated (Hogenhout *et al.*, 2009).

Effectors' influence on plant development and performance. Some effectors affect the host plant's performance and morphology (Hogenhout *et al.*, 2009). Effectors of the AvrBs3 family, which are *Xanthomonas* transcriptional activators, cause cell division and colonization of susceptible hosts (Kay *et al.*, 2007). Effectors can also activate a plant's immune receptors, especially the nucleotide binding domain and proteins that contain repetitive regions rich in leucine (NLR), which enables plants to fight against invasive organisms; this interaction among effectors, their host targets and simultaneous immunity receptors is caused by complicated molecular mechanisms and an

histológicas de las interacciones susceptibles, y la prevalencia de supresores de muerte celular entre los efectores bacterianos T3SS (Janjusevic *et al.*, 2006). El efector Avr3a de *Phytophthora infestans*, suprime la muerte celular hipersensible inducida por otra proteína de *Phytophthora infestans*, la INF1 elicitorina, que apunta a una posible función de virulencia (Bos *et al.*, 2006).

Otra clase de efectores, son los del tipo RXLR, los cuales se caracterizan por tener dentro de su estructura proteica un dominio con aminoácidos RXLR (Arginina-Leucina-Arginina) en su extremo C-terminal. El efector Avr1b de tipo RXLR de *Phytophthora sojae*, también suprime la muerte celular programada inducida por la proteína de ratón BAX en levaduras y plantas (Dou *et al.*, 2008). Sohn (2007) demostró que la administración de los efectores ATR1 y ATR13 de *Hyaloperonospora parasitica* (Pers) aumenta la virulencia de *Pseudomonas syringae*. El ATR13 también suprime la deposición de calosa desencadenada por *Pseudomonas syringae*, lo que sugiere que su acción afecta defensas basales contra patógenos (Sohn *et al.*, 2007). Estos hallazgos indican que, similar a los efectores T3SS bacterianos, los efectores RXLR de oomicetos a menudo funcionan en la supresión de la inmunidad de las plantas. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los efectores RXLR que interfieren con esta inmunidad, aún no se han dilucidado correctamente (Hogenhout *et al.*, 2009).

Influencia de efectores en el desarrollo y comportamiento de la planta. Algunos efectores alteran el comportamiento y morfología de la planta huésped (Hogenhout *et al.*, 2009). Los efectores de la familia AvrBs3, los cuales son activadores transcripcionales de *Xanthomonas*, inducen la división celular y la colonización en hospederos susceptibles (Kay *et al.*, 2007). Los efectores también pueden activar los receptores inmunes de las plantas, especialmente el dominio de unión a nucleótidos

exceptionally dynamic coevolution (Białas *et al.*, 2017). The presence of *Xanthomonas citri* in citrus cells is enough to cause macroscopic hyperplastic lesions similar to canker symptoms caused by the pathogen (Duan *et al.*, 1999). Cankerous lesions cause bacteria to be released from infected tissue and favor their spread. The *Xanthomonas vesicatoria* AvrBs3 effector is also known to cause cell hypertrophy, although the impact of this symptom on bacterial ability is not very clear (Kay *et al.*, 2007). Other organisms associated with plants alter their host's morphology, which causes malformations that create a protective ecological niche or improve their spread. Classic examples include rhizobial nodules (Oldroyd and Downie, 2008), galls caused by *Agrobacterium* spp. (Chalupowicz *et al.*, 2006) and witch's broom caused by phytoplasmas (Hogenhout *et al.*, 2009) (Figure 3).

Natural selection will favor effectors that have effects on the hosts' phenotypes and will improve the pathogen's ability (Hogenhout *et al.*, 2009).

Effector genes evolve more rapidly than the nuclear genome. The rapid evolution of the gene is a hallmark of the pathogen's adaptation (De la Concepcion *et al.*, 2018). The biochemical adaptation of the effectors after they colonize the host is essential for the pathogen's diversification and speciation (Dong *et al.*, 2014). Genes that encode for effector proteins are direct targets of evolutionary forces that drive host and pathogen co-evolution (McCann and Guttman, 2008). Alleles of effectors that successfully increase the pathogen's reproduction will be immediately favored by natural selection. Directional selection or positive selection is a type of natural selection that favors only one allele, and for this reason, the allelic frequency of a population continuously goes in one direction, given that this mechanism can also lead to adaptations (Futuyma, 2013).

y las proteínas que contienen regiones repetitivas ricas en leucina (NLR), permitiendo a las plantas luchar contra los organismos invasores, está interacción entre los efectores, sus objetivos huéspedes y los receptores inmunitarios coincidentes está conformada por intrincados mecanismos moleculares y una coevolución excepcionalmente dinámica (Białas *et al.*, 2017). La presencia de *Xanthomonas citri*, en las células de cítricos, es suficiente para causar lesiones hiperplásicas macroscópicas, análogas a los síntomas de chancro causados por el patógeno (Duan *et al.*, 1999). Las lesiones cancerosas facilitan la liberación bacteriana del tejido infectado y aumentan su diseminación. El efector AvrBs3 de *Xanthomonas vesicatoria* también es conocido por causar hipertrofia celular, aunque el impacto de tal síntoma en la aptitud bacteriana es menos claro (Kay *et al.*, 2007). Otros organismos asociados a plantas alteran la morfología de su planta hospedera, dando como resultado malformaciones que crean un nicho ecológico protector o mejoran la dispersión. Los ejemplos clásicos incluyen nódulos rizobianos (Oldroyd y Downie, 2008), las agallas inducidas por *Agrobacterium* spp (Chalupowicz *et al.*, 2006) y la escoba de bruja causada por fitoplasmas (Hogenhout *et al.*, 2009) (Figura 3).

La selección natural favorecerá a los efectores que tengan efectos en los fenotipos de los hospederos generando una mejora en la aptitud del patógeno (Hogenhout *et al.*, 2009).

Los genes de efectores evolucionan a velocidades mayores en relación con el genoma nuclear. La evolución acelerada del gen es un sello distintivo de la adaptación del patógeno (De la Concepcion *et al.*, 2018). En los efectores la adaptación bioquímica después de la colonización en el hospedero, es de vital importancia para la diversificación y especiación del patógeno (Dong *et al.*, 2014). Los genes que codifican las proteínas efectoras son objetivos

Many effector genes have evolved more quickly than the pathogen's genome and often show extreme levels of positive selection with significantly higher rates of substitution of non-synonymous nucleotides for synonymous nucleotides (Ma and Guttman, 2008). In modular effector proteins, such as the bacterial T3SS effectors and oomycete RXLR effectors, their structural domains are under different selective pressure, depending on whether they function by secretion or conduct effector activity *per se* (Win, 2007). Therefore, terminal-N domains, such as the signal peptide, the RXLR domain and the T3SS directing sequence, typically show low levels of polymorphisms compared to those of the terminal-C effector region (Win *et al.*, 2007).

Besides acting on nucleotide polymorphisms, natural selection acts on the polymorphisms of the number of copies of the effector genes (presence and lack of polymorphisms, and a varying number of gene copies). The effector genes of phytopathogenic fungi are located in loci with a high level of genomic plasticity, including regions rich in transposons and telomerase (Gout *et al.*, 2006), which reduces the genetic recombination capacity and make the host more susceptible to phytopathogenic fungi. Recently, Yoshida *et al.* (2009) demonstrated that two loci of *Magnaporthe oryzae* (Herbert) effectors have a low diversity of nucleotides but a strong presence or lack of polymorphisms. This accelerated evolution of the parasites' genomes will allow pathogens to successfully colonize their hosts and be better adapted to possible changes that in the future may occur in the genome (Jiang *et al.*, 2006).

The association of effector genes with plastic genome loci could provide an adaptation mechanism to host resistance, thus increasing the genetic and epigenetic variation and enabling a rapid evolution (Hogenhout *et al.*, 2009).



**Figura 3. Morfología de plantas causada por patógenos como A) vainas modificadas en plantas de *Sisymbrium irio* B) agallas inducidas por *Agrobacterium* spp y C) escoba de bruja causada por fitoplasmas en plantas de *Capsicum annuum*.
Figure 3. Plant morphology caused by pathogens, such as: A) modified sheaths in *Sisymbrium irio* plants; B) galls caused by *Agrobacterium* spp.; and C) witch's broom caused by phytoplasmas in *Capsicum annuum* plants.**

directos de las fuerzas evolutivas que impulsan la coevolución entre el hospedero y el patógeno (McCann y Guttman, 2008). Los alelos de los efectores que aumentan el éxito reproductivo del patógeno, serán inmediatamente favorecidos por la selección natural. La selección direccional o selección positiva, es un tipo de selección natural que favorece a un solo alelo y por esto la frecuencia alélica de una población continuamente va en una dirección, dado que este mecanismo también puede conducir a adaptaciones (Futuyma, 2013).

Muchos genes efectores han evolucionado a mayores velocidades en comparación con el genoma del patógeno, y con frecuencia muestran niveles extremos de selección positiva con tasas significativamente más altas de sustitución de nucleótidos no sinónimos, a nucleótidos sinónimos (Ma y Guttman, 2008). En las proteínas efectoras modulares, tales como los efectores T3SS bacterianos y los efectores RXLR de oomicetos, sus dominios estructurales están bajo diferentes presiones selectivas, dependiendo de si funcionan en secreción o llevan la actividad efectora *per se* (Win, 2007). Por lo tanto, los dominios terminal-N, tales como

Evolution of effectors. Given that it is obvious that effectors increase the susceptibility to parasites, the host's target alleles will evolve to avoid them. Recessive mutations in the *xa13* rice gene make the promotor of this gene become insensitive to the effectors that activate *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* transcription, which results in disease resistance (Sugio *et al.*, 2007).

Another recessive gene of rice blight resistance (*xa5*) is caused by mutations in the IIIA transcription factor, which supposedly prevents actions performed by the related effector (Iyer-Pascuzzi and McCouch, 2007). Also, mutations in the eIF4E elongation factor evade interactions with the VPg effector of potyvirus (Charron *et al.*, 2008). An allele (Rcr3) of tomato cysteine-protease has also been identified as carrying a mutation that makes the protein insensitive to inhibition by the *Cladosporium fulvum* Avr2 effector (Shabab *et al.*, 2008).

Many more examples are expected to be available in the future, since next-generation sequencing technologies are currently being explored which could systematically probe the

la péptido señal, el dominio RXLR y la secuencia de direccionamiento T3SS, muestran típicamente niveles reducidos de polimorfismo en comparación con la región efectora terminal-C (Win *et al.*, 2007).

Además de actuar sobre los polimorfismos de nucleótidos, la selección natural actúa sobre los polimorfismos del número de copias de los genes efectores (presencia y ausencia de polimorfismos y variación en el número de copias de genes). Los genes efectores de hongos fitopatógenos se localizan en loci con alta plasticidad genómica incluyendo regiones ricas en transposones y telomerasa (Gout *et al.*, 2006), reduciendo la capacidad de recombinación genética y con ello hacer más susceptible al hospedero al ataque de hongos fitopatógenos. Yoshida *et al.* (2009) demostraron recientemente que dos loci efectores de *Magnaporthe oryzae* (Herbert), muestran baja diversidad de nucleótidos, pero un alto grado de presencia o ausencia de polimorfismos. Esta evolución acelerada de los genomas de los parásitos, les permitirá seguir colonizando de forma exitosa a sus hospederos, haciendo que los parásitos estén mejor adaptados a los posibles cambios que en el futuro presenten los genomas de éstos (Jiang *et al.*, 2006).

La asociación de genes de efectores con loci genómicos plásticos, podría conferir un mecanismo de adaptación a la resistencia del hospedero, aumentando la variación genética y epigenética y permitiendo una evolución acelerada (Hogenhout *et al.*, 2009).

Evolución de efectores. Dado que se hace evidente que los efectores aumentan la susceptibilidad a los parásitos, los alelos objetivos del hospedero evolucionarán para eludirlos. Las mutaciones recesivas en arroz en el gen *xa13*, hacen que el promotor de este gen sea insensible a los efectores activadores de la transcripción de *Xanthomonas oryzae* pv. *ory-*

variation in effector sequences as a mechanism to understand the selection evidence (Hogenhout *et al.*, 2009). It is important to completely understand how the tripartite interaction among effectors, target effectors and R proteins (proteins that confer resistance to the host through direct or indirect recognition of a pathogen protein) evolves, given the conflict among the selective forces that occur between plants and pathogens in natural populations (van der Hoorn and Kamoun, 2008).

PERSPECTIVES

The study of effectors promises to be the new synthesis of multidisciplinary studies of parasite-host interactions, and this will mark the beginning of a new epistemological revolution in phytopathology. Effectors are a source of biological innovation whose results are just beginning to be elucidated and will undoubtedly be a rich source of scientific findings in the years to come. Effectors have proved to be some of the most important proteins involved in the eukaryotic cells of plants and animals. Studies of these proteins will provide important knowledge of insects' immune system, bacterial virulence strategies, plant defense mechanisms against bacteria and herbivore insects, and reveal new pathways that affect plant vegetative growth and development. However, the biology of effectors is still in its infancy, and the available knowledge is limited to a few phytopathogen taxa and immunosuppression processes. But the gap could be filled soon by using new DNA sequencing technologies (next-generation sequencing) and the recently arrived "omics." The sequences of pathogen and host genomes could provide a wider phylogenetic scope and thus a more comprehensive understanding of the pathosystem. All this information reinforces the

zae, dando como resultado una resistencia a la enfermedad (Sugio *et al.*, 2007).

Otro gen recesivo de resistencia al tizón del arroz, el *xa5*, es origina por mutaciones en el factor de transcripción IIIA, que presumiblemente impide acciones por el efector afín (Iyer-Pascuzzi y McCouch, 2007). Además las mutaciones en el factor de elongación eIF4E evaden las interacciones con el efector VPg de potyvirus (Charron *et al.*, 2008). También se ha identificado un alelo (*Rcr3*) de la cisteína-proteasa de tomate, portador de una mutación que hace que la proteína sea insensible a la inhibición por el efector *Avr2* de *Cladosporium fulvum* (Shabab *et al.*, 2008).

Se espera que muchos ejemplos adicionales surjan en el futuro, ya que en la actualidad se exploran tecnologías de secuenciación de próxima generación, estas podrán sondear sistemáticamente la variación en las secuencias de los efectores, como un mecanismo para comprender la evidencia de selección (Hogenhout *et al.*, 2009). Una cuestión importante es entender completamente cómo evoluciona la interacción tripartita entre efectores, objetivos efectores y proteínas R (Proteína que confiere resistencia al hospedero por medio del reconocimiento directo o indirecto de una proteína del patógeno), dado el conflicto de las fuerzas selectivas que se producen en las poblaciones naturales entre plantas y patógenos (van der Hoorn y Kamoun, 2008).

PERSPECTIVAS

El estudio de los efectores promete ser la nueva síntesis en los estudios multidisciplinarios de las interacciones parasito-hospedero y con esta la nueva revolución epistemológica dentro de la fitopatología. Los efectores representan una fuente de innovación biológica cuyos alcances apenas

importancia de efectores as a fundamental cog in the wheel of this tripartite interaction. Also, the use of new tools and concepts for studying effectors will have important impacts on evolutionary biology and some of its concepts will be redefined, not to mention the new approaches that are emerging from the current study of “omics,” a new field of genetics that attempts to understand the molecular organization, evolution and architecture of the whole genome. This discipline has started to branch out into the study of proteomics (the study of all the proteins that are produced by an organism) and transcriptomics (the study of all cell RNAm), besides the latest computer system technology that can extrapolate infinite amounts of data, so the new effector biology is about to become the mother of all research about pathosystems.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

empiezan a ser dilucidados y que serán sin duda en los próximos años una rica fuente de descubrimientos científicos. Los efectores han demostrado ser algunas de las proteínas más importantes que tienen función en las células eucariotas de plantas y animales. Los estudios de estas proteínas aportarán importantes conocimientos sobre el sistema inmune de los insectos, estrategias de virulencia bacteriana, mecanismos de defensa de las plantas contra bacterias e insectos herbívoros y podrán revelar nuevas vías que afecten el crecimiento vegetativo y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, la biología de los efectores se encuentra aún en su infancia y el conocimiento sobre éstos se limita a unos pocos taxones de patógenos de plantas y a procesos de inmunosupresión. Pero la brecha podría ser pronto zanjada por el impulso de las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN (secuenciación de próxima generación) y las recién llegadas “ómicas”. Las

secuencias de los genomas de los patógenos y hospederos proporcionarán un panorama filogenético mayor y con este, un entendimiento más profundo del patosistema. Todos estos datos están reforzando la importancia de los efectores como engranaje fundamental de esta interacción tripartita. Además, el impulso de las nuevas herramientas y conceptos en el estudio de los efectores, tendrá repercusiones importantes en la biología evolutiva y la redefinición de algunos de sus conceptos, sin mencionar los nuevos enfoques que están surgiendo con el estudio actual de las “ómicas”, el nuevo campo de la genética que intenta comprender la organización, evolución y arquitectura molecular contenida en el genoma completo. Esta disciplina ha empezado a ramificarse en el estudio de la proteómica (el estudio de todas las proteínas del organismo) o la transcriptómica (el estudio de todos los ARNm de la célula), sumado a la nueva tecnología de sistemas computacionales de última generación que pueden extrapolar cantidades infinitas de datos, la nueva biología efectora esta por consolidarse como la madre de toda la investigación en torno a los patosistemas.

## LITERATURA CITADA

- Abramovitch RB, Anderson JC, and Martin GB. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 601-611. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1984>.
- Amselem J, Vigouroux M, Oberhaensli S, Brown JK, Bindshchedler LV, Skamnioti P, Wicker T, Spanu PD, Quesneville H, and Sacristán S. 2015. Evolution of the EKA family of powdery mildew avirulence-effector genes from the ORF 1 of a LINE retrotransposon. *BMC Genomics* 16: 917. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2185-x>.
- Banfield MJ. 2015. Perturbation of host ubiquitin systems by plant pathogen/pest effector proteins. *Cellular microbiology* 17: 18-25. <https://doi.org/10.1111/cmi.12385>.
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, and Gross DC. 1999. Pseudomonas syringae phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and molecular biology reviews* 63: 266-292. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98966/pdf/mr000266.pdf>
- Białas A, Zess EK, De la Concepcion JC, Franceschetti M, Pennington HG, Yoshida K, Upson JL, Chancud E, Wu C-H, and Langner T. 2017. Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31: 34-45. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-17-0196-FI>.
- Block A, Li G, Fu ZQ, and Alfano JR. 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current opinion in plant biology* 11: 396-403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.007>.
- Bos JL, Kanneganti TD, Young C, Cakir C, Huitema E, Win J, Armstrong MR, Birch PR, and Kamoun S. 2006. The C-terminal half of Phytophthora infestans RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in Nicotiana benthamiana. *The Plant Journal* 48: 165-176. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02866.x>.
- Cai H, Wei W, Davis RE, Chen H, and Zhao Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting Opuntia species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1448-1457. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.65615-0>.
- Chalupowicz L, Barash I, Schwartz M, Aloni R, and Manulis S. 2006. Comparative anatomy of gall development on Gypsophila paniculata induced by bacteria with different mechanisms of pathogenicity. *Planta* 224: 429-437. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0229-9>.
- Charron C, Nicolai M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, Palloix A, and Caranta C. 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The Plant Journal* 54: 56-68. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03407.x>.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, and Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.
- Costacurta A, and Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical reviews in microbiology* 21: 1-18. <http://dx.doi.org/10.3109/10408419509113531>.
- Dagdas YF, Belhaj K, Maqbool A, Chaparro-Garcia A, Pandey P, Petre B, Tabassum N, Cruz-Mireles N, Hughes RK, and Sklenar J. 2016. An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. *Elife* 5: e10856. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10856.001>.
- Damasceno CM, Bishop JG, Ripoll DR, Win J, Kamoun S, and Rose JK. 2008. Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from Phytophthora species suggests coevolution with plant endo-β-1, 3-glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 820-830. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0820>.
- Davis EL, Hussey RS, Mitchum MG, and Baum TJ. 2008. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current opinion in plant biology* 11: 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.003>.
- De la Concepcion JC, Franceschetti M, Maqbool A, Saitoh H, Terauchi R, Kamoun S, and Banfield MJ. 2018. Polymorphic residues in rice NLRs expand binding and response to effectors of the blast pathogen. *Nature plants* 4: 576. Disponible en línea:

- Di X, Cao L, Hughes RK, Tintor N, Banfield MJ, and Takken FL. 2017. Structure–function analysis of the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector allows uncoupling of its immune-suppressing activity from recognition. *New Phytologist* 216: 897-914. <https://doi.org/10.1111/nph.14733>
- Dong S, Stam R, Cano LM, Song J, Sklenar J, Yoshida K, Bozkurt TO, Oliva R, Liu Z, and Tian M. 2014. Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. *Science* 343: 552-555. <http://doi.org/10.1126/science.1246300>.
- Dou D, Kale SD, Wang X, Chen Y, Wang Q, Wang X, Jiang RH, Arredondo FD, Anderson RG, and Thakur PB. 2008. Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *The Plant Cell* 20: 1118-1133. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057067>.
- Duan Y, Castaneda A, Zhao G, Erdos G, and Gabriel D. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 556-560. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.6.556>.
- Futuyma D. 2013. Evolution. 3rd edn. Sunderland, MA. Sinauer Associates, Inc.
- Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, and Rouxel T. 2006. Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol Microbiol* 60: 67-80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x>.
- Hogenhout SA, and Loria R. 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology* 11: 449-456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.007>.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, and Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 115-122. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0115>.
- Hughes DP, Brodeur J, and Thomas F. 2012. *Host manipulation by parasites*. Oxford University Press.
- Hughes R, and Banfield M. 2014. Production of RXLR effector proteins for structural analysis by X-ray crystallography. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1127: 231-253. Disponible en línea:
- Iyer-Pascuzzi AS, and McCouch SR. 2007. Recessive resistance genes and the *Oryza sativa*-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 731-739. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0731>.
- Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, and Stebbins CE. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311: 222-226. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1120131>.
- Jiang RH, Weide R, van de Vondervoort PJ, and Govers F. 2006. Amplification generates modular diversity at an avirulence locus in the pathogen *Phytophthora*. *Genome research* 16: 827-840. <https://doi.org/10.1101/gr.5193806>.
- Kamoun S. 2007. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current opinion in plant biology* 10: 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.017>.
- Kawaide H. 2006. Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70: 583-590. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.583>.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, and Bonas U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318: 648-651. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1144956>.
- Kim MG, Da Cunha L, McFall AJ, Belkadir Y, DebRoy S, Dangel JL, and Mackey D. 2005. Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* 121: 749-759. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.025>.
- Le Fevre R, Evangelisti E, Rey T, and Schornack S. 2015. Modulation of host cell biology by plant pathogenic microbes. *Annual review of cell and developmental biology* 31: 201-229. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cell-bio-102314-112502>.
- Lilley CJ, Maqbool A, Wu D, Yusup HB, Jones LM, Birch PR, Banfield MJ, Urwin PE, and Eves-van den Akker S. 2018. Effector gene birth in plant parasitic nematodes: Neofunctionalization of a housekeeping glutathione synthetase gene. *PLoS genetics* 14: e1007310. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007310>.
- Ma W, and Guttman DS. 2008. Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current opinion in plant biology* 11: 412-419. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.001>.
- MacLean AM, Orlovskis Z, Kowitzanich K, Zdzarska AM, Angenent GC, Immink RG, and Hogenhout SA. 2014. Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS biology* 12: e1001835. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001835>.
- McCann HC, and Guttman DS. 2008. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytologist* 177: 33-47. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02293.x>.
- Mccann L. 2016. Characterisation of the Cf-Ecp2 gene encoding for recognition of the conserved fungal effector Ecp2 in *Solanum pimpinellifolium* and *Nicotiana paniculata*. University of East Anglia.
- Misas-Villamil JC, and Van der Hoorn RA. 2008. Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Current opinion in plant biology* 11: 380-388. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.007>.
- Nemri A, Saunders DG, Anderson C, Upadhyaya NM, Win J, Lawrence G, Jones D, Kamoun S, Ellis J, and Dodds P. 2014. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. *Frontiers in plant science* 5: 98. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00098>.
- Oldroyd GE, and Downie JA. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59: 519-546. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>.
- Panstruga R. 2003. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current opinion in plant biology* 6: 320-326. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00043-8).
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, and Lahaye T. 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter

- activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318: 645-648. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1144958>.
- Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F, and Martin GB. 2007. A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* 448: 370-374. <http://doi.org/10.1038/nature05966>.
- Sarma GN, Manning VA, Ciuffetti LM, and Karplus PA. 2005. Structure of Ptr ToxA: An RGD-containing host-selective toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *The Plant Cell* 17: 3190-3202. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.034918>.
- Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintia R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, and van der Hoorn RA. 2008. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cysteine proteases of tomato. *The Plant Cell* 20: 1169-1183. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056325>.
- Sohn KH, Lei R, Nemri A, and Jones JD. 2007. The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 19: 4077-4090. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054262>.
- Sugio A, Yang B, Zhu T, and White FF. 2007. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsfH1Aγ1* and *OsfX1* during bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 10720-10725. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701742104>.
- Sugio A, MacLean AM, Grieve VM, and Hogenhout SA. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: E1254-E1263. Disponible en línea:
- Thomma BP, van Esse HP, Crous PW, and de Wit PJ. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Molecular plant pathology* 6: 379-393. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x>.
- Tian M, Benedetti B, and Kamoun S. 2005. A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* 138: 1785-1793. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061226>.
- Tian M, Win J, Song J, van der Hoorn R, van der Knaap E, and Kamoun S. 2007. A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol* 143: 364-377. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090050>.
- Tomkins M, Kliot A, Marée AF, and Hogenhout SA. 2018. A multi-layered mechanistic modelling approach to understand how effector genes extend beyond phytoplasma to modulate plant hosts, insect vectors and the environment. *Current opinion in plant biology* 44: 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.002>.
- Tudzynski B. 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied microbiology and biotechnology* 52: 298-310. <https://doi.org/10.1007/s002530051>.
- van der Hoorn RA, and Kamoun S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* 20: 2009-2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>.
- van Esse HP, van't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta KA, Van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, de Wit PJ, and Thomma BP. 2008. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* 20: 1948-1963. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059394>.
- Washington E, Mukhtar M, Finkel O, Wan L, Banfield M, Kieber J, and Dangel J. 2016. *Pseudomonas syringae* type III effector HopAF1 suppresses plant immunity by targeting methionine recycling to block ethylene induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E3577-3586. Disponible en línea:
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, Van West P, and Chapman S. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450: 115-118. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06203>.
- Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva KV, Cano LM, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz BJ, and Kamoun S. 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *The Plant Cell* 19: 2349-2369. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051037>.
- Wirthmueller L, Asai S, Rallapalli G, Sklenar J, Fabro G, Kim DS, Lintermann R, Jaspers P, Wrzaczek M, and Kangasjärvi J. 2018. *Arabidopsis* downy mildew effector HaRxL106 suppresses plant immunity by binding to RADICAL-INDUCED CELL DEATH1. *New Phytologist* 220: 232-248. Disponible en línea:
- Xing W, Zou Y, Liu Q, Liu J, Luo X, Huang Q, Chen S, Zhu L, Bi R, and Hao Q. 2007. The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature* 449: 243-247. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06109>.
- Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J et al. 2009. Association Genetics Reveals Three Novel Avirulence Genes from the Rice Blast Fungal Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* 21: 1573-1591. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066324>.
- Zhou J-M, and Chai J. 2008. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* 11: 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.004>.