ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

UNIVERSITY OF CRETE



Διδακτορική Διατριβή

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Α. ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ

Ανάλυση βακτηριακών γονιδιωμάτων και εκκρινόμενων πρωτεϊνικών τελεστών για την μελέτη των μοριακών μηχανισμών παθογένειας της Ξανθομονάδας

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

Ιανουάριος 2021



Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Φ. Σαρρής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παναγιώτης Φ. Σαρρής: Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Exeter

Κρίτων Καλαντίδης: Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης: Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παναγιώτης Φ. Σαρρής: Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Exeter

Κρίτων Καλαντίδης: Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης: Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Παναγιώτης Μόσχου: Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης και Πανεπιστημίου της Upssala

Ευσταθία Σκούλικα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Παυλίδης: Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Εμμανουήλ Τραντάς: Επίκουρος Καθηγητής Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου

Το έργο χρηματοδοτήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), με αρ. Σύμβασης Έργου 4776 και από το εσωτερικό πρόγραμμα υποστήριξης υποψήφιων διδακτόρων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB-FORTH).

Προλεγόμενα

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, υπό την επίβλεψη του καθ. Παναγιώτη Σαρρή και της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, που αποτελούνταν από τους καθ. Π. Σαρρή, καθ. Κ. Καλαντίδη και καθ. Κ. Κοτζαμπάση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπή καθ. Π. Μόσχου, Ε. Σκούλικα, Ι. Παυλίδη, Ε. Τραντά και τους προαναφερθέντες καθ. Π. Σαρρή, Κ. Καλαντίδη και Κ. Κοτζαμπάση που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα Δ.Δ. και για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Μία ξεχωριστή παράγραφος ευχαριστιών ανήκει στον Καθηγητή μου Παναγιώτη Σαρρή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να κάνω την αρχή στο εργαστήριό του στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, για τις πολύτιμες συμβουλές, τη συνεχή καθοδήγησή και για την αμέριστη υποστήριξή του οποτεδήποτε σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ακόμη, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους συναδέρφους και φίλους μου στο Εργαστήριο, τη Δρ. Γλυκερία Μέρμηγκα για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε και τον Δρ. Χρήστο Χρηστάκη και Υπ. Διδάκτορες Κωνσταντίνο Κωτσαρίδη και Δήμητρα Τσακίρη. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όσους πέρασαν από το εργαστήριο, κάποιοι υπό την επίβλεψή μου, που όμως όλοι συνέβαλαν στις ευχάριστες ώρες που περάσαμε. Τους Μετ. φοιτητές Αργυρούλα Αμαρτωλού και Μαλαματένια Δελησάββα, Υπ. Μετ. φοιτητές Σοφία Πετσαγγουράκη, Σταυρούλα Δημητριάδη, Ανθή Ψωμά και Νίκο Αραπίτσα, Πτυχιούχους Φοιτητές Γεωργία Δασκαλογιάννη και Όλγα Ξηνταράκου και επί Πτυχίω Φοιτητές Μάνθο Σερτεδάκη και Νίκη Αστροπεκάκη.

Το τελευταίο ευχαριστώ το αφήνω για τους γονείς μου, που συνέβαλλαν ποικιλοτρόπως σε όλη την Ακαδημαϊκή μου πορεία και τους δεύτερους γονείς μου για την αμέριστη υποστήριξή τους, καθώς επίσης και το σύζυγό μου και το γιό μου, που ήρθε στη ζωή κατά τη διάρκεια της ΔΔ και στους οποίους την αφιερώνω.

Contents

Προλεγόμενα	3
Περίληψη	7
Abstract	8
Κεφάλαιο 1ο	9
Ανακάλυψη των υποκυτταρικών στόχων ενός βακτηριακού τελεστή της ξανθομα και η αναζήτηση του μοριακού μηχανισμού παθογένειας	ονάδας 9
Αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή	9
Παθογένεια των Gram – αρνητικών βακτηριακών παθογόνων	10
Ρόλος των τελεστών στο κύτταρο-ζενιστή	
Παθογένεια της ζανθομονάδας	20
Εζωκυτταρικοί παράγοντες παθογένειας της ζανθομονάδας	
Εκκριτικό Σύστημα Τύπου ΙΙ της ζανθομονάδας	25
Εκκριτικό σύστημα τύπου VI της ζανθομονάδας	
Εκκριτικό σύστημα τύπου ΙV της ζανθομονάδας	27
Εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ της ζανθομονάδας	27
Οι τελεστές της ζανθομονάδας	28
Επίπεδα της άμυνας σε φυτά και ζώα	31
Το σύμπλοκο εζωκύττωσης	44
Εμπλοκή του συμπλόκου εζωκύτωσης στην άμυνα	51
Σκοπός της εργασίας	55
Αποτελέσματα	56
Ι. Μελέτη αλληλεπίδρασης συντηρημένων βακτηριακών παραγόντων παθο της Ξανθομονάδας με πρωτεϊνικά-δολώματα ενσωματωμένα σε υποδοχείς Νι ζενιστή	νγένειας LR του 56
II. Εύρεση του πραγματικού στόχου του τελεστή XccXopP στο κύτταρο τ	<i>`0</i> V
ζενιστή και ανάλυση της αλληλεπίδρασής τους	60
III. Διερεύνηση του μηχανισμού παθογένειας του XccXopP	73
Συζήτηση	92
Υλικά και Μέθοδοι	103
Φυτικά είδη	103
Βακτηριακά είδη και στελέχη	103
Κλωνοποίηση και δημιουργία κατασκευών	104
Φυλογενετική ανάλυση του ΧccXopP	110
	5

Y2H and Y3H αναλύσεις	110
Υποκυττάριος εντοπισμός/συν-εντοπισμός και BiFC	113
Δοκιμασία Αντίδρασης Υπερευαισθησίας (HR)	114
Έκκριση καλλόζης	114
Πρωτεϊνική εκχύλιση και συν-κατακρήμνιση	114
Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοστύπωμα κατά Western	115
Βιβλιογραφία	117
Κεφάλαιο 2°	176
Αλληλούχιση του γονιδιώματος τριών ξανθομονάδων, σημαντικών παθογόνων των	
φυτών	176
Εισαγωγή	176
Xanthomonas oryzae	178
Xanthomonas hortorum	179
Xanthomonas citri	180
Σκοπός της εργασίας	183
Αποτελέσματα – Συζήτηση	184
Αλληλούχιση τριών ειδών του γένους Xanthomonas	184
Υλικά και Μέθοδοι	189
Βακτηριακά είδη και στελέχη	189
Απομόνωση γενωμικού DNA	189
Αλληλούχιση των βακτηριακών γονιδιωμάτων	189
Βιβλιογραφία	190
Παράρτημα Ι	193
Παράρτημα ΙΙ	196
Παράρτημα ΙΙΙ	206
Δημοσιεύσεις	227

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια γίνονται εντατικές προσπάθειες για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αλληλεπίδρασης των παθογόνων με τους ξενιστές τους. Οι προσπάθειες αυτές εστιάζουν τόσο στη διαλεύκανση των μηχανισμών παθογένειας των μικροοργανισμών, όσο και στους μηχανισμούς άμυνας που έχουν αναπτύξει οι οργανισμοί – ξενιστές τους. Όσον αφορά στα βακτηριακά παθογόνα, η αλληλούχιση ολοένα και περισσότερων γονιδιωμάτων την τελευταία πενταετία οδηγεί στην καλύτερη κατανόηση των βασικών και εξειδικευμένων μηχανισμών παθογένειας που αυτά φέρουν.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή χωρίζεται σε δυο κεφάλαια. Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται η εύρεση νέων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τελεστών παθογένειας βακτηρίων και των πιθανών στόχων τους στον ξενιστή. Ακολουθούν τα αποτελέσματα της ανάλυση ενός ζεύγους αλληλεπίδρασης, του βακτηριακού συντηρημένου τελεστή XopP της Xanthomonas campestris παθότυπου campestris και του παράγοντα EXO70B1 του συμπλέγματος εξωκύττωσης του Arabidopsis thaliana, η οποία φαίνεται ότι είναι ειδική και ισχυρή. Στη συνέχεια, αναλύονται τα ευρήματά μας, όσον αφορά το μηχανισμό παθογένειας του XccXopP. Ο συγκεκριμένος τελεστής φαίνεται πως προκαλεί την καταστολή της βασικής άμυνας του ξενιστή του, μέσω αλληλεπίδρασης με διάφορα μέλη του συμπλόκου εξωκύττωσης, χωρίς να ενεργοποιεί την ειδική άμυνα του ξενιστή.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση του γονιδιώματος τριών ειδών της ξανθομονάδας, αντιπροσωπευτικών για το είδος τους. Συγκεκριμένα, αναλύονται τα χαρακτηριστικά που ευρέθησαν από τα γονιδιώματα των Xanthomonas oryzae παθότυπο oryzicola, Xanthomonas hortorum παθότυπο hederae και Xanthomonas citri υποείδος malvacearum. Φαίνεται πως και τα τρία βακτήρια αυτά, διαθέτουν αρκετούς από τους συντηρημένους τελεστές, που εκκρίνονται από το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ, καθώς επίσης και δομικές και εκκρινόμενες πρωτεΐνες των εκκριτικών συστημάτων τύπου Ι, ΙΙ, ΙV και VI.

Abstract

Intensive research during the past years has been made to elucidate the molecular mechanisms of pathogens' interaction with their hosts, in plant disease. The research focuses both on understanding of basic pathogenic mechanisms of microorganisms and on the host responses, developed as a counter-defense. Sequencing of more bacterial genomes in the last five years leads to a better understanding in depth of the molecular mechanisms of host-pathogen interactions.

This doctoral dissertation is divided in two chapters. In the first and more extended chapter of this work, new interactions between bacterial pathogens and their potential host targets are presented. Furthermore, the results of the analysis of a pair of interaction are shown. In particular, we show that the exocyst component EXO70B1 of *Arabidopsis* thaliana is a specific target of XopP, which is a conserved type-III effector of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Next, our findings regarding the virulence mechanisms of *Xcc*XopP are analyzed in depth. This effector appears to suppress the host's basal defense (PTI), through interacting with various members of the exocyst complex, without activating the host's specific defense (ETI).

The second chapter presents the results of full-genome sequencing of three type strains bacteria of genus *Xanthomonas*. Specifically, the characteristics found in the genomes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola, Xanthomonas hortorum* pv. *hederae* and *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* are shown. All three sequenced bacteria appear to encode for most of the conserved type-III effectors, as well as structural and secreted proteins of the secretory apparatuses of type I, II, IV and VI.

Κεφάλαιο 1ο

Στο 1° κεφάλαιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάζονται, η εισαγωγή στις μοριακές αλληλεπιδράσεις Παθογόνου-Ξενιστή και τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν στην ανακάλυψη των αλληλεπιδράσεων ενός τελεστή παθογένειας, από το βακτήριο ξανθομονάδα, με πρωτεΐνες στόχους, του κυττάρου-ξενιστή, καθώς και την μελέτη του μοριακού μηχανισμού παθογένειάς. Στο τέλος του κεφαλαίου παρατίθεται η σχετική βιβλιογραφία.

Ανακάλυψη των υποκυτταρικών στόχων ενός βακτηριακού τελεστή της ξανθομονάδας και η αναζήτηση του μοριακού μηχανισμού παθογένειας.

Αλληλεπίδραση παθογόνου – ξενιστή

Τα τελευταία χρόνια γίνονται εντατικές προσπάθειες για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών αλληλεπίδρασης των παθογόνων με τους ξενιστές τους. Οι μελέτες αυτές εστιάζουν τόσο στη διαλεύκανση των μηχανισμών παθογένειας των μικροοργανισμών, όσο και στους μηχανισμούς άμυνας που έχουν αναπτύξει οι οργανισμοί – ξενιστές τους. Όσον αφορά στα βακτηριακά παθογόνα, η αλληλούχιση ολοένα και περισσότερων γονιδιωμάτων οδηγεί στην καλύτερη κατανόηση των βασικών και εξειδικευμένων μηχανισμών παθογένειας που αυτά φέρουν. Επιπλέον από τα αποτελέσματα διαφόρων επιστημονικών μελετών, γίνεται σαφές ότι τα παθογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν κοινούς μηχανισμούς παθογένειας για να αποικίσουν ευκαρυωτικούς ξενιστές από διάφορα βασίλεια π.χ. θηλαστικά, φυτά, έντομα κ.α. (Arbeloa et al., 2011; Costa et al., 2015; Hueck, 1998; Sarris et al., 2012).

Στη συνέχεια, θα γίνει εκτενής αναφορά της παθογένειας των Gramαρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων, καθώς και των μηχανισμών άμυνας που ενεργοποιούν ως απάντηση οι ξενιστές τους. Στην προκειμένη περίπτωση, θα εστιάσουμε στους μηχανισμούς των φυτικών-ξενιστών, αφού αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλο μελέτης των μοριακών αλληλεπιδράσεων, στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Επιπλέον, θα αναφερθούμε στους κοινούς και μη, μηχανισμούς παθογένειας με τα παθογόνα των θηλαστικών, καθώς και των αμυντικών μηχανισμών που φέρουν οι ξενιστές τους.

Παθογένεια των Gram – αρνητικών βακτηριακών παθογόνων

παθογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν Τα Gram-αρνητικά κοινούς μηχανισμούς για τον αποικισμό και τη μόλυνση τόσο των κυττάρων των θηλαστικών, όσο και των φυτικών κυττάρων. Οι μηγανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν μία πληθώρα εξωκυτταρικών παραγόντων, όπως είναι: 1) οι πολυσακγαρίτες και συγκεκριμένα οι εξωκυτταρικοί πολυσακγαρίτες (Extracellular Polysaccharides, EPS), που συμβάλλουν στην ανάπτυξη βιοφίλμ (biofilm), 2) οι αντχεσίνες, 3) οι τοξίνες και 4) τα ένζυμα αποδόμησης. Το πιο καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα ελέγχου έκκρισης EPS, σχηματισμού βιοφίλμ και διαφοροποίησης αποτελεί η ρύθμιση της «Αίσθησης του Πληθυσμού» (Quorum Sensing, QS). Η «Αίσθηση του Πληθυσμού» ουσιαστικά αποτελεί έναν μηχανισμό, με τον οποίο επιτυγχάνεται η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του βακτηριακού πληθυσμού και η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, ως απόκριση σε αλλαγές του περιβάλλοντος και της πυκνότητας του κυτταρικού τους πληθυσμού (Vu et al., 2009). Από την άλλη, η έκκριση EPS και ο σγηματισμός βιοφίλμ αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα και των παθογόνων βακτηρίων, όπως για παράδειγμα του ανθρωποπαθογόνου Pseudomonas aeruginosa, το οποίο μεγαλώνει και πολλαπλασιάζεται εντός ενός βιοφίλμ που σκοπό έγει την προστασία των βακτηριακών κυττάρων από τα αντιβιοτικά (Costerton et al., 1999; Vu et al., 2009).

Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, το παθογόνο βακτήριο πρέπει να έρθει σε επαφή με το κύτταρο-ξενιστή. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν οι αντχεσίνες (οι πρωτεΐνες πρόσφυσης), οι οποίες είτε σχηματίζουν δομές τύπου-pilus (δηλαδή εξαρτήματα του βακτηριακού κυττάρου που ομοιάζουν με τριχίδια ή κροσσούς), είτε βρίσκονται συνδεδεμένες στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και την πρόσδεση σε συγκεκριμένα τμήματα υποδοχέων του ξενιστή (Soto and Hultgren, 1999). Συγκεκριμένα, οι αντχεσίνες των παθογόνων βακτηρίων των θηλαστικών, προσδένονται άμεσα σε κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή, ενώ οι αντίστοιχες των φυτοπαθογόνων βακτηρίων δεν έχουν εξακριβωμένο ρόλο στη διαδικασία προσκόλλησης. Αυτό συμβαίνει λόγω της ύπαρξης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, το οποίο αποτελεί φυσικό εμπόδιο στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση (Büttner and Bonas, 2003).

Εκτός, από τους εξωκυτταρικούς παράγοντες παθογένειας, η παθογόνος ικανότητα των βακτηρίων έγκειται και σε πρωτεϊνικής φύσεως μόρια, τα οποία εκκρίνονται στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή, μέσω διαφόρων εξειδικευμένων συστημάτων έκκρισης (Secretion Systems, SS). Έως σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί δέκα βακτηριακά συστήματα έκκρισης. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια έγουν βρεθεί εννέα από αυτά τα εκκριτικά συστήματα. Τα διάφορα εκκριτικά συστήματα των βακτηρίων διαφέρουν κυρίως ως προς την περιπλοκότητα των πρωτεϊνών που τα απαρτίζουν, αλλά και ως προς τη λειτουργία τους και τη φύση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται διαμέσου αυτών (Εικ. 1) (Costa et al., 2015; Green and Mecsas, 2016; Palmer et al., 2020). Συγκεκριμένα, κάποιες εκκρινόμενες πρωτεΐνες διασχίζουν τις δύο βακτηριακές φωσφολιπιδικές μεμβράνες των Gram-αρνητικών βακτηρίων σε δύο διακριτά στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αρχική μετακίνηση των πρωτεϊνών στο περίπλασμα (δηλαδή στο χώρο μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου) μέσω του μονοπατιού έκκρισης Sec ή Tat. Στη συνέχεια, στο δεύτερο στάδιο, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης στον εξωκυττάριο χώρο από ένα δεύτερο σύστημα μεταφοράς. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το σύστημα έκκρισης τύπου ΙΙ (Εικ. 1A), αλλά και τα συστήματα έκκρισης τύπου V, το "Chaperone-usher" και το σύστημα βιογένεσης "curli" (Εικ. 1Β), τα οποία διασχίζουν μόνο την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη. Επομένως, και στα τρία τελευταία συστήματα έκκρισης, απαιτείται προαναφερθέντα ένα σύστημα μεταφορέας που βρίσκεται στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη 11

(μονοπάτι Sec ή SecYEG translocon), προκειμένου η εκκρινόμενη πρωτεΐνη να εισέλθει στο περίπλασμα (Costa et al., 2015). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε σε ορισμένα Gram-αρνητικά βακτήρια ένα ακόμη εκκριτικό σύστημα (το τύπου-Χ, T10SS), στο οποίο η έκκριση των διαφόρων υποστρωμάτων πραγματοποιείται σε δύο στάδια, όπως και στα προηγούμενα (Εικ. 1Γ). Παρόλα αυτά ο μηχανισμός, με τον οποίο η εκκρινόμενη πρωτεΐνη εισέρχεται στο περίπλασμα, δεν είναι γνωστός για όλα τα Gram-αρνητικά βακτήρια που διαθέτουν αυτό το εκκριτικό σύστημα (Palmer et al., 2020).

Επιπλέον, στα Gram-αρνητικά βακτήρια, υπάρχουν συστήματα έκκρισης και διαμετακόμισης πρωτεϊνών, τα οποία μεταφέρουν τα υποστρώματά τους διαμέσου των δύο βακτηριακών μεμβρανών ανεξάρτητα από τα μονοπάτια Sec ή Tat, δηλαδή από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα είτε στον εξωκυττάριο χώρο (έκκριση), όπως συμβαίνει στην περίπτωση του συστήματος έκκρισης τύπου Ι, είτε άμεσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή (διαμετακόμιση), όπως στις περιπτώσεις των συστημάτων τύπου ΙΙΙ, ΙV και VI (Green and Mecsas, 2016). Επομένως, αυτά τα συστήματα έκκρισης/διαμετακόμισης διαπερνούν και τις δύο μεμβράνες του βακτηριακού κυττάρου (Εικ. 1Α). Τέλος, τα μυκοβακτήρια και κάποια Gram-θετικά βακτήρια της τάξης των Corynebacteriales διαθέτουν μία πλασματική μεμβράνη αντίστοιχη με την εσωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων και μία εξωτερική λιπιδική μεμβράνη, που ονομάζεται μυκομεμβράνη. Σε αυτά έχει βρεθεί το εκκριτικό σύστημα τύπου VII, το οποίο χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να μεταφέρουν στον εξωκυτταρικό χώρο, με άγνωστο μηχανισμό, διάφορα υποστρώματα (Εικ. 1Δ). Βέβαια, το εκκριτικό αυτό σύστημα έχει βρεθεί και σε άλλα Gram-θετικά βακτήρια, που δε διαθέτουν εξωτερική μυκομεμβράνη, όπως είναι τα παθογόνα των θηλαστικών Staphylococcus aureus και Bacillus anthracis (Costa et al., 2015; Green and Mecsas, 2016).



Εικόνα 1. Απεικόνιση των διαφόρων εκκριτικών συστημάτων στα Gram αρνητικά βακτήρια και του T7SS των Gram θετικών βακτηρίων. Α. Τα εκκριτικά συστήματα τύπου Ι, ΙΙΙ, ΙV και VI διαπερνούν και τις δύο βακτηριακές μεμβράνες σε ένα μόνο βήμα, ενώ στο σύστημα τύπου ΙΙ οι πρωτεΐνες μεταφέρονται πρώτα διαμέσου του Sec ή Tat μονοπατιού στο περίπλασμα και στη συνέχεια μέσω του T2SS στον εξωκυτταρικό χώρο. **B**. Αντίθετα, το εκκριτικό σύστημα τύπου V, το σύστημα έκκρισης "chaperone-usher" και το σύστημα βιογένεσης "curli" διαπερνούν μόνο την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη, ενώ οι εκκριτικό σύστημα τύπου X, το σποίο βρέθηκε πρόσφατα και απαντάται σε διάφορα γένη βακτηρίων, διαπερνά είτε την εξωτερική είτε και τις δύο βακτηριακές μεμβράνες και οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες εκκρίνονται σε δύο διακριτά στάδια (Costa et al., 2015). **Δ**. Το εκκριτικό σύστημα τύπου VIΙ έχει βρεθεί μόνο σε μυκοβακτήρια, τα οποία διαθέτουν μία πλασματική μεμβράνη, αντίστοιχη της εσωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων. Σε αυτό το σύστημα, ο μηχανισμός με τον οποίο εκκρίνονται τα διάφορα υποστρώματα στον εξωκυττάριο χώρο παραμένει άγνωστος (Palmer et al., 2020).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ (T3SS) βρίσκεται σε πολλά Gramαρνητικά παθογόνα βακτήρια τόσο των θηλαστικών, όπως η Salmonella, η Shigella, η Yersinia, κ.α., όσο και σε παθογόνα των φυτών και των εντόμων, όπως τα Xanthomonas και τα Pseudomonas, αλλά και σε φυτικούς βακτηριακούς συμβιώτες όπως βακτήρια του γένους Rhizobium. Το εκκριτικό αυτό σύστημα είναι ανεξάρτητο από το μονοπάτι έκκρισης Sec, αν και κατά το σχηματισμό της βασικής διαμεμβρανικής συσκευής του συστήματος, φαίνεται να απαιτείται το μονοπάτι αυτό, καθώς πολλά από τα επιμέρους πρωτεϊνικά συστατικά του διαθέτουν αμινοτελικά σινιάλα έκκρισης μέσω του Sec μονοπατιού. Το T3SS αποτελείται από 9 συντηρημένες πρωτεΐνες και από επιπλέον 10 έως 20 πρωτεΐνες, οι οποίες διαδραματίζουν ουσιώδεις ή λιγότερο σημαντικές λειτουργίες του συστήματος. Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του T3SS φέρουν το σινιάλο έκκρισης στα πρώτα αμινοξέα τους. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ίσως το σινιάλο έκκρισης να εντοπίζεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του αγγελιοφόρου RNA τους (5' UTR) (Anderson and Schneewind, 1997; Habyarimana and Ahmer, 2013). Αυτό το σινιάλο δεν υπόκειται σε κάποια μορφή αμινοτελικής τροποποίησης κατά την έκκριση. Ακόμη, και στο σύστημα μεταφοράς της φλαγγελίνης (flagellar system), έχει βρεθεί ότι η περιοχή στην 5' UTR είναι η κρίσιμη για την έκκριση της φλαγγελίνης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο fliC, στην Escherichia coli (Majander et al., 2005). Επιπλέον, ορισμένες από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες μεταφέρονται στη «βάση» του συστήματος με τη βοήθεια κάποιων «μοριακών συνοδών-ενζύμων» (chaperones). Η επικράτεια πρόσδεσης των chaperones στους τελεστές βρίσκεται στην περιοχή ακριβώς μετά την περιοχή σηματοδότησης της έκκρισης (Habyarimana and Ahmer, 2013). Μέσω του συστήματος τύπου ΙΙΙ κατά κύριο λόγο μεταφέρονται πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθογένεια και γι' αυτό το λόγο οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες ονομάζονται «τελεστές» (effectors). (Costa et al., 2015; Hueck, 1998).

Οι διαφορές του εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ ανάμεσα στα παθογόνα των θηλαστικών και των φυτών έγκεινται κυρίως σε δομικές διαφορές του εξωκυτταρικού τμήματος της μηγανής. Στα παθογόνα των θηλαστικών, το εκκριτικό σύστημα αποτελείται από μία βελόνη (needle), η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή των τελεστών στα κύτταρα του ξενιστή, ενώ στα φυτοπαθογόνα βακτήρια, το εκκριτικό τους σύστημα συνδέεται με μία δομή τύπου pilus, η οποία έγει μεγαλύτερο μήκος, περίπου 200 νανομέτρων και έχει την ικανότητα να διασχίζει το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών – ξενιστών, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται οι τελεστές στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή (Büttner and Bonas, 2003; Green and Mecsas, 2016) (Εικ. 2). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι παθογόνα των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, όπως τα γένη Shigella και το είδος Salmonella typhimurium έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται εντός των κυττάρων του φυτικού είδους Arabidopsis thaliana, προσπερνώντας το αμυντικό της σύστημα (Jo et al., 2019; Schikora et al., 2008).



Εικόνα 2. Τα συστήματα έκκρισης τύπου ΙΙΙ (T3SS) και ο ρόλος τους στις βακτηριακές αλληλεπιδράσεις με φυτά και ζώα. (α) Το T3SS των παθογόνων βακτηρίων των φυτών συνδέεται με μία δομή τύπου-pilus, η οποία εκτείνεται έως το τοίχωμα των φυτικών κυττάρων (μήκους 200 nm) και χρησιμεύει ως το κανάλι-αγωγός για τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες. Μεταξύ των εκκρινόμενων πρωτεϊνών είναι οι χαρπίνες (κίτρινο χρώμα) που πιθανώς δρουν στην επιφάνεια των φυτικών κυττάρων και οι πρωτεΐνες-τελεστές (σκούρο πράσινο χρώμα). Η

μετατόπιση των τελεστών στο κύτταρο ξενιστή προκαλείται από την πρωτεΐνη-μεταφορέα (translocon) του T3SS, ένα σύμπλεγμα βακτηριακών πρωτεϊνών που ακουμπάει στην πλασματική μεμβράνη του ξενιστή (PM) (Büttner and Bonas, 2003). (β) Το T3SS των ζωικών παθογόνων βακτηρίων αποτελείται από μια δομή βελόνας, που είναι σημαντικά μικρότερη από τη δομή τύπου-pilus. Η μετατόπιση των τελεστών στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή προκαλείται από το translocon. Επιπλέον, αρκετά ζωικά παθογόνα βακτήρια (π.χ. τα είδη *Salmonella* και *Shigella*) είναι σε θέση να προσληφθούν τα ίδια, εκτός από τους τελεστές που εκκρίνουν, από μη-φαγοκυτταρικά κύτταρα (Donnenberg, 2000).

Ρόλος των τελεστών στο κύτταρο-ζενιστή

Οι τελεστές των παθογόνων βακτηρίων αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια πολυ-λειτουργικών πρωτεϊνών, οι οποίες αφού μεταφερθούν, κυρίως μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ, μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, μετατοπίζονται στον τελικό τους στόχο, για να τροποποιήσουν τη φυσιολογία του ευκαρυωτικού κυττάρου (Dean, 2011). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, η τελική θέση των τελεστών μέσα στο κύτταρο ποικίλλει σημαντικά (πυρήνας, μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες, κυτταρόπλασμα), όπως επίσης και οι τροποποιήσεις που επιφέρουν στους εκεί-ευρισκόμενους στόχους τους. Συγκεκριμένα, το φυτοπαθογόνο βακτήριο Ralstonia solanacearum, που ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια, εκκρίνει μεταξύ άλλων τον τελεστή PopP2, ο οποίος είναι μία ακετυλο-τρασνφεράση της οικογένειας YopJ (της Yersinia). Αυτή προσδένεται και ακετυλιώνει τις λυσίνες διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων τύπου-WRKY, με αποτέλεσμα να τροποποιεί τις αμυντικές αποκρίσεις στο Arabidopsis thaliana (Le Roux et al., 2015; Sarris et al., 2015). Επιπλέον, ο τελεστής AvrPtoB της Pseudomonas syringae, που έχει δράση E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης, αλληλεπιδρά άμεσα με τα μόρια ουβικουϊτίνης και αποδομεί την κινάση Fen μέσω του πρωτεασώματος (Abramovitch and Martin, 2005; Rosebrock et al., 2007). Επιπλέον, ο ίδιος τελεστής πρόσφατα βρέθηκε ότι έχει συγγένεια και με άλλο υπόστρωμα, την EXO70B1 του συμπλόκου εξωκύτωσης της A. thaliana (Wang et al., 2019c).

Επίσης, ορισμένοι τελεστές φαίνεται να έχουν δράση και σε διάφορα κυτταρικά οργανίδια του κυττάρου-ξενιστή, όπως είναι τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες (για τους φυτικούς ξενιστές). Συγκεκριμένα, ο HopG1

της P. syringae στοχεύει τα μιτοχόνδρια, μέσω του σινιάλου-στόχευσης που βρίσκεται στα πρώτα 13 αμινοξέα της αλληλουχίας του, αν και αρχικώς δεν είχε εντοπιστεί το προβλεπόμενο σινιάλο εισόδου στα μιτοχόνδρια (MTS). Το αποτέλεσμα της στόχευσης αυτής είναι να προκαλεί μεγάλες αλλαγές στην ανάπτυξη των ειδών A. thaliana, Nicotiana tabacum και Solanum lycopersicum. Στις αλλαγές αυτές περιλαμβάνονται ο νανισμός, η αυξημένη διακλάδωση και η στειρότητα (Block et al., 2010). Επιπλέον, βρέθηκε ότι στην Α. thaliana ο ίδιος τελεστής αλληλεπιδρά με την κινεσίνη των μιτοχονδρίων, προκαλώντας αλλαγές στην αρχιτεκτονική των ινιδίων ακτίνης. Με αυτό τον τρόπο επιφέρει τα συμπτώματα της ασθένειας στους ευπαθείς ξενιστές (Shimono et al., 2016). Επίσης, ο τελεστής HopI1 της ίδιας ψευδομονάδας μεταφέρεται στον γλωροπλάστη του κυττάρου-ξενιστή, όπου στογεύει την πρωτεΐνη Hsp70 (Heat Shock Protein 70) και καταστέλλει τη σύνθεση σαλικυλικού οξέος (SA). Με τον τρόπο αυτό διαταράσσει τελικά τη δομή των θυλακοειδών του γλωροπλάστη (Jelenska et al., 2007). Επιπλέον, ο ΗορΙ1 καταστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από άλλους τελεστές στον ξενιστή Ν. tabacum, παρεμβαίνοντας έτσι στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του ξενιστή (Wei et al., 2018).

Παρόλα αυτά, για την πλειονότητα των βακτηριακών τελεστών, δεν γνωρίζουμε τη μοριακή δράση τους ούτε τους υποκυτταρικούς στόχους τους μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, αν και γνωρίζουμε ότι εμπλέκονται στη διατάραξη φυσιολογικών λειτουργιών των ξενιστών τους και στην εμφάνιση σοβαρών συμπτωμάτων σε αυτούς. Παράδειγμα αποτελεί ο τελεστής XopP του γένους Xanthomonas, που αποτελεί έναν από τους εννιά συντηρημένους τελεστές του βακτηριακού γένους και έναν από τους τρεις στο είδος Xanthomonas campestris (Michalopoulou et al., 2020; Roux et al., 2015; Ryan et al., 2011; Vicente and Holub, 2013). Ο βακτηριακός αυτός τελεστής ανακαλύφθηκε μέσω του εργαλείου αναφοράς AvrBs2. Δηλαδή, ενός βακτηριακού τελεστή που εκκρίνεται μέσω του T3S συστήματος και αναγνωρίζεται από το συστημα άμυνας του ξενιστή (μέσω του ανοσοϋποδοχέα BS2) (Roden et al., 2004). Τα πρώτα δεδομένα για τον τελεστή προέκυψαν όταν βρέθηκε πως ο XopP συνεισφέρει ανεξάρτητα από άλλους εκκρινόμενους τελεστές στην παθογένεια του Xanthomonas campestris (Xcc) στελέχους 8004 (Jiang et al., 2009). Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση ενός ορθόλογου του τελεστή, ο XooXopP από το βακτήριο X. oryzae παθότυπου oryzae (παθογόνο του ρυζιού) και βρέθηκε πως καταστέλλει ισχυρά τη βασική άμυνα του ξενιστή, αλληλεπιδρώντας με την PUB44, μία E3-λιγάση της ouβικουϊτίνης, αναστέλλοντας τη δράση της (Ishikawa et al., 2014).



Εικόνα 3. Λειτουργίες των τελεστών μέσα στο κύτταρο-ξενιστή. Παρουσιάζονται οι δράσεις των τελεστών από ένα ευρύ φάσμα παθογόνων των φυτών και των ζώων, αφού μετατοπιστούν στην τελική τους θέση και αλληλεπιδράσουν με το στόχο τους. Κατηγοριοποιούνται οι κυριότερες λειτουργικές τάξεις με βάση τον τελικό στόχο και χωρίζονται στην εικόνα με διακεκομμένες γραμμές. Οι τελεστές φέρουν διαφορετικό χρώμα ανάλογα με το γένος από το οποίο προέρχονται (τα φυτοπαθογόνα ομαδοποιούνται όλα μαζί με κίτρινο χρώμα) (Dean, 2011).

Παθογένεια της ζανθομονάδας

Η ξανθομονάδα αποτελεί ένα ευρύ γένος βακτηρίων, που ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια και στην κλάση των γ-πρωτεοβακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά έχουν ραβδοειδές σχήμα, κινούνται χάρη στο πολικό μαστίγιό τους και αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασία μεταξύ 25 έως 30 βαθμών κελσίου. Η ανάπτυξη τους σε θρεπτικό στέρεο υπόστρωμα είναι χαρακτηριστική εξαιτίας της κίτρινης χρωστικής που εκκρίνουν, της ξανθομοναδίνης. Το γένος Xanthomonas συνδέεται εξελικτικά με ανθρώπινα παθογόνα του είδους Stenotrophomonas ευκαιριακά maltophilia, που προηγουμένως ονομαζόταν Xanthomonas maltophilia (Büttner and Bonas, 2010). Παρόλα αυτά, το γένος Xanthomonas έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την μελέτη της παθογένειας σε φυτικούς ξενιστές. Αποτελείται από 35 είδη, τα οποία προκαλούν πολύ σοβαρές ασθένειες σε πληθώρα φυτικών ειδών, τόσο μονοκότυλων όσο και δικότυλων (Timilsina et al., 2020). Στον πίνακα 1 και στην εικόνα 4 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά είδη της ξανθομονάδας, οι ξενιστές τους οποίους προσβάλλουν, καθώς και τα συμπτώματα που προκαλούν. Τα παθογόνα είδη φέρουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή που προσβάλλουν, αλλά ακόμη και ως προς τον ιστό τον οποίο αποικίζουν. Για παράδειγμα, το βακτήριο Xanthomonas campestris παθότυπος campestris μολύνει φυτά της οικογένειας των σταυρανθών (Brassicaceae) εισέρχοντας μέσω του ξυλώματος των ξενιστών του, ενώ στο ίδιο είδος ο παθότυπος armoriaceae εισβάλλει στα παρεγγυματικά κύτταρα του μεσοφύλλου φυτών του γένους Brassica (An et al., 2020).

Πίνακας 1. Απεικόνιση των διαφόρων ειδών και παθοτύπων της ξανθομονάδας και της ασθένειας που προκαλούν στους ξενιστές τους οποίους αποικίζουν και προσβάλλουν (An et al., 2020).

Είδος	Παθότυπος	Ακρω-	Ξενιστής	Ασθένεια	Ταξινομικός
		νύμιο			Κωδικός (NCBI)
X. albilineans			Ζαχαροκάλαμο	Έγκαυμα φύλλων	txid29447
				(leaf scald)	
X. alfalfae			Τριφύλλι	Βακτηριακή	txid366650
				κηλίδωση των	
				φύλλων	
X. arboricola	pruni	Хар	Δέντρα και	Βακτηριακή	txid69929
			θαμνοι του	κηλιδωση	
		V	$\gamma \varepsilon v o \upsilon \varsigma Prunus$	M	4: 1407020
	punicae	хср	Ροοια	Μαρασμος των	tx1048/838
	in a lan dia	Vai	Ποοσιμή	φυλλων	tw: d105700
	jugianais	хај	Περσικη	Μαρασμος των	tx1d195709
			(Αγγλικη) καρυδιά	καρυσιων	
X. axonopodis	manihotis	Xam	Cassava	Βακτηριακός	txid43353
			(Manihot	Μαρασμός	
			esculenta)		
X. campestris	armoriaceae	Xca	Χρένο	Βακτηριακή	txid329463
			(Αγριοράπανο)	κηλίδωση των	
				φύλλων	
	campestris	Xcc	Σταυρανθή	Σήψη	txid340
	leersiae	Xcl	Πολυετή	Βακτηριακή	txid487875
		**	αγρωστώδη	ράβδωση (streak)	
	musacearum	Xcm	Μπανάνα	Μαρασμό των μπανανοειδών	tx1d454958
	raphani	Xcr	Κραμβοειδείς	Βακτηριακή	txid359385
			ποικιλίες	κηλίδωση των	
				φύλλων	
	vitians	Xcv	Μαρούλι	Βακτηριακή	txid83224
				κηλίδωση των	
				φύλλων	
X. cannabis			Κάναβη η ήμερη	Βακτηριακή	txid1885674
				κηλίδωση των	
				φύλλων	
X. citri	citri	Xcci	Είδη του γένους	Έλκος των	txid611301
	-		Citrus	εσπεριδοειδών	
	fuscans	Xcf	Φασολιά	Βακτηριακός	txid366649
		**		Μαρασμός	
	glycines	Xcg	Σόγια	Βακτηριακή	txid473421
			D 0/	φλύκταινα (pustule)	
	malvacearum	Xcm	Βαμβάκι	Βακτηριακός	tx1d86040
				Μαρασμός	

	mangiferaeind	Xmi	Μάνγκο	Βακτηριακή μαύρη	txid454594
	icae			κηλίδωση	
	punicae	Хср	Ροδιά	Μαρασμός των φύλλων	txid487838
X.cucurbitae			Κολοκυνθοειδή	Βακτηριακή κηλίδωση	txid56453
X. cynarae			Αγκινάρα	Βακτηριακή μαύρη κηλίδωση	txid10214
X. euvesicatoria	X. campestris pv. vesicatoria	Xav	Πιπεριά και ντοματιά	Βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων	txid456327
X. floridensis			Κάρδαμο	-	txid1843580
X. fragariae			Φράουλα	Βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων υπό γωνία	txid48664
X. gardneri			Πιπεριά και ντοματιά	Βακτηριακή κηλίδωση	txid90270
X. maliensis			Ρύζι, ζαχαροκάλαμο	-	txid1321368
X. nasturtii			Κάρδαμο	-	txid1843581
X. oryzae	oryzae	Xoo	Ρύζι	Βακτηριακός Μαρασμός	txid64187
	oryzicola	Xoc	Ρύζι	Βακτηριακή ράβδωση (streak)	txid129394
X. perforans			Ντοματιά	Βακτηριακή κηλίδωση	txid442694
X. phaseoli	phaseoli	Хср	Φασολιά	Βακτηριακός Μαρασμός	txid1985254
X. prunicola			Νεκταρινιά	-	NCBI:txid205393 0
X. pseudoalbilineans	Μη καταχωρημ	ένο στη βι	άση δεδομένων του]	NCBI	
X. sacchari			Ζαχαροκάλαμο	Χλωρωτική ράβδωση	txid56458
X. translucens	translucens	Xtt	Σιτάρι	Μαύρη φλοιοποίηση του στελέχους (black chaff)	txid134875
	undulosa	Xtu	Σιτάρι	Μαύρη φλοιοποίηση του στελέχους (black chaff)	txid487909
X. vasicola	vasculorum	Xvv	Ζαχαροκάλαμο	«Κολλώδης» ασθένεια (gumming disease)	txid325776

Οι αναλύσεις των γονιδιωμάτων διαφόρων ειδών ξανθομονάδας έχει οδηγήσει στη καλύτερη κατανόηση της βακτηριακής ταξινόμησης και εξέλιξης των παθογόνων, καθώς επίσης και των παραγόντων παθογένειας του γένους αυτού. Συγκεκριμένα, από το 2011, όπου μόνο 11 στελέχη ξανθομονάδας ήταν πλήρως αλληλουχημένα και 7 ακόμη προσχέδια ήταν σε εξέλιξη (Ryan et al., 2011), σήμερα υπάρχουν διαθέσιμα περίπου 223 γονιδιώματα στη βάση δεδομένων NCBI (An et al., 2020).



Εικόνα 4. Κύκλος ζωής και τα συμπτώματα της ξανθομονάδας. (Α). Απεικόνιση μοντέλου με τον κύκλο ζωής του παθογόνου Xanthomonas campestris παθότυπου campestris (Xcc), που προκαλεί τις μαύρες σηπτικές κηλίδες σε φυτικά είδη του γένους Brassica. Όπως οι περισσότερες ξανθομονάδες, έτσι και η Χcc μπορεί να επιβιώσει σε φυτικά υπολείμματα στο έδαφος έως και δύο χρόνια, αλλά όχι παραπάνω από έξι εβδομάδες σε ελεύθερο φυτικών υπολειμμάτων έδαφος. Το βακτήριο Χcc έχει επίσης την ικανότητα να αποικίζει τα φυτικά σπέρματα, τα οποία αποτελούν και μία κοινή οδό μετάδοσης ασθενειών. Επιπλέον, η Χες μπορεί ακόμη να μεταδοθεί από προσβεβλημένα σε υγιή φυτά μέσω περιβαλλοντικών και μηχανικών μέσων. Μετά τη βλάστηση των αποικισθέντων σπερμάτων, το σπορόφυτο προσβάλλεται, με εκδήλωση φαινοτύπων συρρίκνωσης και μαυρίσματος των περιθωρίων τους. Τέλος, το βακτήριο μπορεί ακόμη να εισβάλλει μέσα σε ώριμα φυτά μέσω των υδατωδών, αν και οι προσβολές των φύλλων και του ριζικού συστήματος από έντομα μπορούν επίσης να αποτελέσουν εναλλακτικές δίοδοι του βακτηρίου. Αυτά τα σημεία εισόδου συνήθως προσφέρουν ένα άμεσο μονοπάτι για το φυτικό αγγειακό σύστημα (δηλαδή το ξύλωμα και το φλοίωμα) οδηγώντας στην συστηματική προσβολή τους. Κατά την ανάπτυξη της ασθένειας, κυριαρχούν νεκρωτικές βλάβες κατά μήκος των ορίων των φύλλων, σε σχήμα V. Η ασθένεια πήρε το όνομα από το μαύρο χρώμα που παίρνουν τα αγγεία στις νεκρωτικές περιοχές. (B). Παραδείγματα των συμπτωμάτων ασθένειας που προκαλούνται από διάφορα είδη Xanthomonas. (i, ii) Σήψη (μαύρες κηλίδες) του λάχανου που προκλήθηκε από το βακτηριακό είδος Xanthomonas campestris παθότυπος campestris. (iii, iv) Ασθένεια «Σαράκι των εσπεριδοειδών» μίας λεμονιάς που προκλήθηκε από το βακτηριακό είδος Xanthomonas citri παθότυπος citri.(v, vi) Βακτηριακή ράβδωση των φύλλων ρυζιού που προκλήθηκε από το βακτηριακό είδος Xanthomonas oryzae παθότυπος oryzicola. (vii, viii) Βακτηριακός Μαρασμός του ρυζιού που προκλήθηκε από το βακτηριακό είδος Xanthomonas oryzae παθότυπος oryzae.

Εζωκυτταρικοί παράγοντες παθογένειας της ζανθομονάδας

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην παθογένεια των βακτηρίων συμβάλλουν μεταξύ άλλων και εξωκυτταρικοί παράγοντες, όπως οι αντχεσίνες, λιποπολυσακχαρίτες ή/και τοξίνες. Συγκεκριμένα, αναφέραμε ότι υπάρχουν αντχεσίνες κροσσωτού τύπου και μη, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση του βακτηρίου σε επιφάνειες και ειδικά στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή. Παρομοίως, οι ξανθομονάδες εκφράζουν τέτοιου τύπου πρωτεΐνες, οι οποίες συμβάλλουν στην παθογένειά τους. Συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για ξεχωριστά στάδια της μόλυνσης, όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες XadA και XadB, οι οποίες επηρεάζουν την προσκόλληση και την είσοδο της ξανθομονάδας στον ξενιστή και η PilQ, η οποία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση του βακτηρίου *X. oryzae* παθότυπος *oryzae* σε όλο το φύλλο του ρυζιού (Das et al., 2009).

Επιπλέον των αντχεσινών, οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και ο εξωτερικός πολυσακχαρίτης, ξανθάνη, που εκκρίνουν οι ξανθομονάδες, συμβάλλουν και αυτές με τη σειρά τους στην παθογένεια του βακτηρίου (Ryan et al., 2011). Μάλιστα, η ξανθάνη, που προκύπτει από τη ζύμωση σακχάρων, χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία ως προσθετικό τροφίμων, κ.α. Κωδικοποιείται από το σύμπλεγμα των γονιδίων gum, το οποίο αποτελείται από 12 γονίδια. Συγκεκριμένα, αυτά απουσιάζουν από το είδος *X. albilineans* (Pieretti et al., 2009). Τα γονίδια βιοσύνθεσης των λιποπολυσακχαριτών ποικίλλουν σημαντικά ως προς το μέγεθος και τη σύσταση τους, τόσο μεταξύ διαφορετικών ειδών και παθοτύπων, όσο και μεταξύ στελεχών. Παρόλα αυτά η μεγάλη αυτή ποικιλομορφία δε φαίνεται να συσχετίζεται με την εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή ή τον ιστό τον οποίο αποικίζουν οι ξανθομονάδες (Lu et al., 2008). Επιπλέον, το είδος X. albilineans παράγει την τοξίνη αλμπισιντίνη, η οποία έχει φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ο πιθανός στόχος αυτής της τοξίνης είναι η γυράση Α του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA), με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η αντιγραφή του cpDNA και τελικά η διαφοροποίηση των χλωροπλαστών (Pieretti et al., 2009). Η τοξίνη αυτή συντίθεται από μία υβριδική συνθάση (NRPS-PKS, <u>Non-Ribosomal Peptide Synthetase-Polyketide Synthase</u>), η οποία έχει βρεθεί και σε άλλα είδη, όπως στα είδη X. axonopodis παθότυπο citri και X. oryzae παθότυπο oryzicola. Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστό έως σήμερα εάν και άλλα είδη παράγουν την ίδια ή παρόμοιες τοξίνες (Ryan et al., 2011).

Πέραν των εξωκυτταρικών παραγόντων παθογένειας που αναφέρθηκαν, οι ξανθομονάδες διαθέτουν και εκκριτικά συστήματα, με τα οποία μεταφέρουν παράγοντες παθογένειας στο εσωτερικό των κυττάρωνξενιστών τους. Παρακάτω πραγματοποιείται μία εκτενής αναφορά των εκκριτικών συστημάτων της ξανθομονάδας.

Εκκριτικό Σύστημα Τύπου ΙΙ της ζανθομονάδας

Οι ξανθομονάδες, προκειμένου να διασπάσουν το κυτταρικό τοίχωμα των ξενιστών τους, εκκρίνουν διάφορα ένζυμα αποδόμησης μέσω του εκκριτικού τους συστήματος τύπου ΙΙ (T2SS). Συγκεκριμένα, όλες οι ξανθομονάδες διαθέτουν ένα T2SS, που ονομάζεται Xps, το οποίο έχει δειχθεί ότι προάγει τη μολυσματικότητα στα είδη X. campestris παθότυπος campestris, X. oryzae παθότυπος oryzae, X. oryzae παθότυπος oryzicola και X. euvesicatoria (Dow et al., 1987; Szczesny et al., 2010; Wang et al., 2008). Επιπλέον, ένα δεύτερο T2SS είναι γνωστό, το xcs σύμπλεγμα γονιδίων, το οποίο βρίσκεται μόνο σε συγκεκριμένα είδη, χωρίς να είναι γνωστό εάν συμβάλλει στην παθογένειά τους. Το xcs απουσιάζει από στελέχη των ειδών X. populi, X. fragarie και X. oryzae, ενώ στα είδη X. arboricola, X. vasicola, X. oryzae παθότυπος oryzicola και X. vasicola, το συμπλέγματος αυτού. Παρόλα αυτά, το δεύτερο αυτό σύμπλεγμα γονιδίων συμπληρώνει εν μέρει την απώλεια των ομόλογων xps γονιδίων, με αποτέλεσμα τελικά να κωδικοποιούνται λειτουργικές πρωτεΐνες του T2S συστήματος (Szczesny et al., 2010; Timilsina et al., 2020).

Η συγγένεια του T2SS ως προς τα διάφορα υποστρώματα, τα οποία εκκρίνονται διαμέσου αυτού, μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ειδών της ξανθομονάδας. Στο είδος X. campestris παθότυπο vesicatoria (Xcv), η ξυλανάση C (XynC) αποτελεί ένα υπόστρωμα του T2SS, του τύπου Xps, η οποία συμβάλλει και στην παθογένεια του είδους αυτού. Παρόλα αυτά, όταν εξετάστηκαν ομόλογα υποστρώματα από άλλα είδη ξανθομονάδας, αυτά δεν είχαν την ικανότητα να εκκριθούν από το T2SS του είδους Xcv (Szczesny et al., 2010). Επιπλέον, συγκριτική ανάλυση της πρωτεΐνης XpsD, που σχηματίζει το κανάλι έκκρισης στο Xps σύστημα, αποκάλυψε τρεις αμινοξικές διαφορές που πιθανόν εμπλέκονται στην ιστοειδική μόλυνση των διαφόρων ειδών ξανθομονάδας (Lu et al., 2008).

Εκκριτικό σύστημα τύπου VI της ζανθομονάδας

Το εκκριτικό σύστημα τύπου VI των παθογόνων των θηλαστικών εμπλέκεται σε αλληλεπίδρασεις με προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά γειτονικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου και του χειρισμού της παθογένειας. Αντίθετα, το T6SS των φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι σημαντικό για την αλληλεπίδραση κυρίως με άλλα προκαρυωτικά μικρόβια της κοινότητας, ενώ δεν έχει δειχθεί κάποια άμεση σχέση με τον αποικισμό των ξενιστών. Συγκεκριμένα, στα είδη της ξανθομονάδας έχουν χαρακτηριστεί τρία T6SS, που καθένα υπάρχει σε συγκεκριμένα είδη (Sarris et al., 2012; Timilsina et al., 2020). Για παράδειγμα, και τα δύο συμπλέγματα γονιδίων του T6SS (Ι και ΙΙ) του παθογόνου του ρυζιού *Χ. oryzae* παθότυπος *oryzicola* δεν εμπλέκονται στην παθογένεια της ξανθομονάδας, αλλά το σύμπλεγμα T6SS-II διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βακτηριακή θανάτωση, υποθέτοντας πως με αυτό τον τρόπο συμβάλλει στον ενδο-βακτηριακό ανταγωνισμό (Zhu et al., 2020).

Εκκριτικό σύστημα τύπου ΙV της ζανθομονάδας

Το εκκριτικό σύστημα τύπου IV εμπλέκεται στη μεταφορά τελεστών μέσω της βακτηριακής μεμβράνης στον εξωκυτταρικό χώρο ή κατευθείαν στο κυτταρόπλασμα προκαυρωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, στο είδος X. citri βρέθηκε ένα σύστημα έκκρισης τύπου IV, το οποίο μεταφέρει τοξικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να σκοτώσουν γειτονικά βακτήρια-ανταγωνιστές του (Souza et al., 2015). Οι δομικές πρωτεΐνες του εκκριτικού αυτού συστήματος κωδικοποιούνται από το χρωμοσωμικό οπερόνιο VirB του βακτηρίου, ενώ η έκφρασή τους ρυθμίζεται από τη συντηρημένη ρυθμιστική πρωτεΐνη CsrA (Cenens et al., 2020).

Εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ της ζανθομονάδας

Το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ (T3SS) ή διαφορετικά το Hrp σύστημα (Hypersensitive Response and Pathogenicity, Hrp) απαντάται σε όλα σχεδόν τα είδη ξανθομονάδας που εμφανίζουν παθογένεια σε κάποιο ξενιστή και είναι υπεύθυνο για τη διαμετακόμιση των τελεστών στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή. Εξαίρεση αποτελεί το είδος Χ. albilineans που δε διαθέτει το τυπικό σύστημα T3SS, αλλά ένα σύστημα που ομοιάζει με το SPI-1 (Salmonella Pathogenicity Island 1) των ειδών Erwinia (Pieretti et al., 2009). Το βακτήριο αυτό προκαλεί τη σοβαρή ασθένεια εγκαύματος στα φύλλα του ζαχαροκάλαμου. Επιπλέον, τα είδη X. maliensis και X. sacchari δε διαθέτουν καθόλου T3SS (Timilsina et al., 2020). Το γονιδίωμα του X. maliensis έχει αλληλουχηθεί πρόσφατα, ενώ δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα αν προκαλεί παθογένεια σε κάποιο φυτικό είδος (Jacobs et al., 2015). Αντίθετα, έχουν αλληλουχηθεί τρία στελέχη του βακτηρίου X. sacchari (LMG 476, NCPPB 4393 και R1), τα οποία αποτελούν παθογόνα του ζαχαροκάλαμου, ενώ είναι και ανταγωνιστής για ορισμένα παθογόνα του ρυζιού (Fang et al., 2015). Οι τελεστές, όπως καλούνται οι πρωτεΐνες παθογένειας των βακτηρίων, εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή και αλλάζουν τη φυσιολογία του για την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, διευκολύνουν τη μόλυνση ή/και μπλοκάρουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Το τελευταίο έχει ως αποτέλεσμα να σταματά η αναγνώριση του παθογόνου και η επαγωγή των αμυντικών αποκρίσεων του ξενιστή.

Οι τελεστές της ξανθομονάδας

Οι τελεστές της ξανθομονάδας (Xop, <u>X</u>anthomonas <u>Outer Proteins</u>) έχουν δειχθεί να στοχεύουν τη βασική άμυνα των φυτών PTI που επάγεται από PAMPs (<u>PAMP-Triggered Immunity</u>). Συγκεκριμένα στο είδος *Xanthomonas campestris* παθότυπου *campestris* στελέχους ATCC33913 έχουν βρεθεί 21 τελεστές, που προκαλούν την παθογένεια στους ξενιστές τους ή επάγουν την ανθεκτικότητα (Ryan et al., 2011; Vicente and Holub, 2013). Παραδείγμα αποτελεί ο XopAU τελεστής από το είδος *Xanthomonas euvesicatoria* ο οποίος χειραγωγεί τη σηματοδότηση μέσω των MAPK κινασών και οι AvrXv4, XopJ_{Xe} και XopD_{Xe} τελεστές, οι οποίοι παρεμβαίνουν στο σύστημα του πρωτεασώματος μέσω της ουβικουϊτινίωσης πρωτεϊνών του ξενιστή (Timilsina et al., 2020).

Επιπλέον, έχουν περιγραφεί τελεστές που δρουν ως καταστολείς της ΕΤΙ, όπως για παράδειγμα ο XopQ από το είδος X. euvesicatoria ο οποίος αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TFT4 της ντομάτας και της πιπεριάς και καταστέλλει την ειδική άμυνα που προκαλείται μέσω αυτής (Teper et al., 2014).

Οι περισσότερες αλληλουχημένες ξανθομονάδες περιέχουν εννέα συντηρημένα γονίδια που κωδικοποιούν για τελεστές και συγκεκριμένα τα *xopR*, *avrBs2*, *xopK*, *xopL*, *xopP*, *xopQ*, *xopX* και *xopZ* (Ryan et al., 2011; Vicente and Holub, 2013). Στο είδος *X. campestris*, που αποτελεί πολύ σημαντικό παθογόνο των σταυρανθών που προκαλεί συμπτώματα σήψης ή ράβδωσης ή κηλίδωσης των φύλλων, οι πιο συντηρημένοι τελεστές περιορίζονται στους XopP, XopF1 και XopAL1 (Roux et al., 2015). Στον πίνακα 2, συνοψίζονται οι κύριοι συντηρημένοι τελεστές της

ξανθομονάδας, καθώς και άλλοι που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι εμπλέκονται στην παθογένεια.

Συγκεκριμένα, αναφέρονται οι ταυτότητες των γονιδίων στο είδος X. campestris παθότυπου campestris και των ομόλογων τους στον παθότυπο vesicatoria.

Πίνακας 2. Απεικόνιση των συντηρημένων και μη-, τελεστών της Xanthomonas campestris παθότυπος campestris, καθώς επίσης και των ορθόλογων γονιδίων στη Xanthomonas campestris παθότυπος vesicatoria.

Κατηγορία τελεστών	ΙD γονιδίου στο στέλεχος ATCC 33913 (type strain)	ΙD ορθόλογου γονιδίου στο στέλεχος 85-10	Λειτουργία πρωτεΐνης και συμμετοχή στην παθογένεια
	Συντηρημένοι (cor	e) τελεστές	
AvrBs2	XCC0052	XCV0052	 Φωσφοδιεστεράση (Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase) Αμολυσματικό γονίδιο (Avr) στα είδη <i>B. juncea</i>, <i>B. carinata</i> και <i>B.</i> <i>oleracea</i> και επάγει HR στα είδη πιπεριάς (Ignatov et al., 2002)(Castañeda et al., 2005). Καταστολέας PTI άμυνας (Huang et al., 2020)
ХорК	XCC2899	XCV3215	 Ε3 λιγάση ουβικουϊτίνης (Qin et al., 2018) Καταστολέας ΡΤΙ άμυνας (Huang et al., 2020)
XopL	XCC4186	XCV3220	 Τελεστής με περιοχή πλούσια σε αμινοξέα λευκίνης, Ε3 λιγάση ουβικουϊτίνης (Singer et al., 2013) Μειωμένη μολυσματικότητα σε μεταλλάγμα της ξανθομονάδας (Jiang et al., 2009), Καταστολέας PTI άμυνας (Huang et al., 2020)
XopN	XCC0231	XCV2944	 Φέρει επαναλαμβανόμενα μοτίβα ARM/HEAT Μειωμένη μολυσματικότητα σε μεταλλάγμα της ξανθομονάδας (Jiang et al., 2008), συνεισφέρει στη μολυσματικότητα στην ξανθομονάδα Xoo (Liao et al., 2020), Καταστολέας της PTI άμυνας (Huang et al., 2020; Kim et al., 2009)
XopP	XCC1247	XCV1236	 Άγνωστη λειτουργία

			 Μειωμένη μολυσματικότητα σε μεταλλάγμα της ξανθομονάδας (Jiang et al., 2009), αναστολέας της PTI άμυνας στο ρύζι (Ishikawa et al., 2014)
XopQ	XCC1072	XCV4438	 Πιθανή δράση ριβοϋδρολάσης ινοσινών-ουριδινών Μειωμένη μολυσματικότητα σε μεταλλάγμα της ξανθομονάδας (Jiang et al., 2009), στοχεύει το μονοπάτι άμυνας που διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες 14-3-3 του ρυζιού (Deb et al., 2019)
XopR	XCC0258	XCV0285	 Καταστολέας της βασικής άμυνας του Arabidopsis (Akimoto- Tomiyama et al., 2012), (Medina et al., 2018)
ХорХ	XCC0529, XCC0530	XCV0572	 Πρωτεΐνη πλούσια σε αμινοξέα μεθειονίνης Καταστολέας της PTI άμυνας (Huang et al., 2020)
XopZ	XCC1975	XCV2059	 Συνεισφορά στη μολυσματικότητα της ξανθομονάδας Xoo (Song and Yang, 2010), Καταστολέας του μονοπατιού άμυνας που διαμεσολαβείται από την LipA (Sinha et al., 2013)
	Άλλοι μη-συντ	ηρημένοι τελεστές	
ХорО	-	XCV1055	 Άγνωστη λειτουργία Πρόκληση συμπτωμάτων σε ευαίσθητα φύλλα της ντομάτας
XopS	XCC4130	XCV0324	 Καταστολέας της PTI άμυνας (Popov et al., 2016; Schulze et al., 2012)
XopF1	XCC1218	XCV0414	 Άγνωστη λειτουργία Ο τελεστής XopF1 από την ξανθομονάδα Xoc προκαλεί HR σε ανθεκτικά φύλλα N. benthamiana (non-host resistance) (Li et al., 2015)
XopAL1	XCC1246	XCV2280 (XopE2)	 Μειωμένη μολυσματικότητα σε μεταλλάγμα της ξανθομονάδας (Jiang et al., 2009)

Επίπεδα της άμυνας σε φυτά και ζώα

Διαμεμβρανικοί υποδοχείς

Τόσο οι φυτικοί όσο και οι ζωικοί οργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με μία πληθώρα παθογόνων μικροοργανισμών, τους οποίους καλούνται να αντιμετωπίσουν, προκειμένου να επιβιώσουν. Τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζώα, δε διαθέτουν κύτταρα σε κυκλοφορία όπως αυτά της λέμφου και του αίματος των ζώων. Επίσης δε διαθέτουν προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα (Dodds and Rathjen, 2010; Sarris et al., 2015). Αντίθετα, στηρίζονται σε ένα σύστημα έμφυτης ανοσίας που φέρουν σε κάθε κύτταρό τους (Duxbury et al., 2016; Jones and Dangl, 2006).

Το σύστημα άμυνας των φυτών διαθέτει τρία επίπεδα, τα οποία θα αναλυθούν σε αυτό το σημείο.

Αρχικά, τα παθογόνα βακτήρια θα πρέπει να καταφέρουν να εισέλθουν στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, δηλαδή ανάμεσα στο κυτταρικό τοίχωμα και στην πλασματική τους μεμβράνη. Ο φραγμός αυτός, μέσω του κυτταρικού τοιχώματος, αποτελεί το πρώτο επίπεδο άμυνας των φυτών. Η διέλευση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων επιτυγγάνεται είτε μέσω ανοιγτών πόρων όπως είναι τα στόματα, τα υδατώδη ή τα νεκτάρια των ανθέων είτε μέσω μηγανικών βλαβών που μπορεί να προκληθούν από διάφορους παράγοντες. Στη συνέχεια, τα παθογόνα των φυτών θα έρθουν αντιμέτωπα με την έμφυτη ανοσία των ξενιστών, που αποτελεί το δεύτερο επίπεδο άμυνας. Το επίπεδο αυτό της φυτικής άμυνας βασίζεται στην ύπαρξη ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων PRRs (Pattern-recognition Receptors) (Gu et al., 2017; Zipfel, 2014). Οι PRRs αναγνωρίζουν διάφορα συντηρημένα μοτίβα των παθογόνων γνωστά ως MAMPs ή PAMPs (Microbe-associated Molecular Patterns ή Pathogen-associated Molecular Patterns). Στα μοτίβα αυτά περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη φλαγγελίνη του μαστιγίου των βακτηρίων, n πεπτιδογλυκάνη και διάφοροι λιποπολυσακχαρίτες, που αποτελούν συστατικά των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων, καθώς επίσης και η χιτίνη, που αποτελεί

συστατικό των μυκητιακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Τα συντηρημένα αυτά μοτίβα αποτελούν μόρια της επιφάνειας των ίδιων των παθογόνων. Επιπλέον, οι PRRs στους φυτικούς ξενιστές (όπως έχει περιγραφεί και στους ζωικούς ξενιστές) (Haney et al., 2014; Robatzek, 2007), μπορεί να ενεργοποιηθούν και μέσω αποδομημένων μορίων των κυτταρικών τοιχωμάτων και της κυτταρικής μεμβράνης του ίδιου του ξενιστή. Τα υπολείμματα αυτά των κυττάρων του ξενιστή προκύπτουν από τη δράση ενζύμων αποδόμησης των παθογόνων μικροοργανισμών και είναι γνωστά ως DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns). Σε αυτήν την προϊόντα αποδόμησης κατηγορία ανήκουν της πηκτίνης, των ολιγογαλακτουρινιδίων, ημικυτταρίνης όπως ολιγομερή της ξυλογλυκάνης ή και προϊόντα αποδόμησης της κυτταρίνης (Malukani et al., 2020).

Οι PRRs υποδοχείς των φυτών φέρουν στο εξωκυτταρικό μέρος τους μία επικράτεια πλούσια σε αμινοξέα λευκίνης (Leucine-rich repeat, LRR), στην οποία προσδένεται το μόριο αναγνώρισης του παθογόνου (ligand). Εσωτερικά, οι φυτικοί PRRs ενδέχεται να φέρουν μία επικράτεια κινάσης και σε αυτήν την περίπτωση ονομάζονται υποδοχείς κινάσης ή υποδοχείςτύπου κινάσης (Receptor Kinases, RKs or Receptor-like Kinases, RLKs). Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις η επικράτεια αυτή απουσιάζει και οι πρωτεΐνες αναγνώρισης ονομάζονται πρωτεΐνες τύπου-υποδογέα (Receptor-like Proteins, RLPs). Συνήθως αυτή η κατηγορία υποδοχέων, καθώς δε φέρει εσωτερικά κάποια επικράτεια σηματοδότησης. συνεργάζεται με υποδοχείς κινασών ή με ενδοκυτταρικές ελέυθερες κινάσες (Zipfel, 2014).

Η αναγνώριση των συντηρημένων μοτίβων, που επιτυγχάνεται μέσω των PRRs, επιφέρει μία σειρά από σηματοδοτικές αλλαγές, που εμπλέκουν μονοπάτια σηματοδότησης πρωτεϊνικών κινασών (MAPK), τα οποία τελικά ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων εμπλεκομένων στην άμυνα. Οι φυτικοί PRRs συνήθως δρουν σε ζεύγη όπου ο ένας είναι συμπαράγοντας (co-PRR). Μαζί ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK, για την ενεργοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα. Τέτοιου είδους γονίδια αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοντες WRKY (Εικ. 5) (Haney et al., 2014).

Οι υποδοχείς PRRs των θηλαστικών ονομάζονται υποδοχείς TLRs (Tolllike receptors) και φέρουν μία εξωκυτταρική LRR επικράτεια, όπως και οι αντίστιγοι υποδογείς των φυτών, με την οποία αλληλεπιδρούν με τα διάφορα MAMPs/PAMPs και μία ενδοκυτταρική TIR επικράτεια (Toll/interleukin receptor). Η ενδοκυτταρική αυτή επικράτεια αλληλεπιδρά με τη σειρά της με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, που φέρουν TIR επικράτειες, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου και του NF-kB. Ο τελευταίος πρόκειται για ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, που εμπλέκονται στη φλεγμονή και συμμετέχει ρύθμιση φλεγμονοσώματος. Τελικά, στη του πραγματοποιείται, λοιπόν η σύνθεση κυτοκινών και αντιμικροβιακών παραγόντων, για την καταπολέμηση των παθογόνων (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Ο μηχανισμός της αναγνώρισης και της σηματοδότησης της πρωτεΐνης φλαγγελίνης υποδηλώνει συγκλίνουσα εξέλιξη στην πρόσληψη των MAMPs από φυτά και ζώα. Οι αντίστοιχοι υποδοχείς φλαγγελίνης (που ονομάζονται FLS2 στα φυτά και TLR5 στα ζώα) αναγνωρίζουν διακριτούς επιτόπους της βακτηριακής φλαγγελίνης. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς PRRs, τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, φέρουν μία παρόμοια εξωκυτταρική περιοχή υποδοχέα LRR, αλλά διαφέρουν ως προς την επικράτεια που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή. Η περαιτέρω σηματοδότηση στα φυτά και στα ζώα χρησιμοποιεί έναν καταρράκτη κινασών (MAPK), αλλά οι συγκεκριμένοι μοριακοί «παίκτες» συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με PRRs και των οικογενειών μεταγραφικών παραγόντων δεν είναι συντηρημένοι στα δύο βασίλεια. Τα μονοπάτια στη σηματοδότηση της άμυνας τόσο μέσω του FLS2 στα φυτά όσο και μέσω του TLR5 στα ζώα 33

απλουστεύονται σε μεγάλο βαθμό στην παρούσα εικόνα για να τονίσουν συγκεκριμένες ομοιότητες και διαφορές στις δύο κατηγορίες (Haney et al., 2014).

Στα φυτά, η ενεργοποίηση της άμυνας μέσω της αναγνώρισης των PAMPs ή DAMPs από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οδηγεί σε αυτό που ονομάζεται βασική άμυνα των φυτών, γνωστή ως <u>PAMP-Triggered</u> Immunity (PTI). Αυτή περιλαμβάνει την απόκριση πολλών κυτταρικών διεργασιών όπως την επαγωγή έκφρασης ιόντων ασβεστίου και ενεργών μορφών οξυγόνου (<u>Reactive Oxygen Species, ROS</u>) που δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και την ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται κατά τη μίτωση (MAPKs) και κινασών που εξαρτώνται από το ασβέστιο (CDPKs). Τελικά, αυτές οι κινάσες ρυθμίζουν τη μεταγραφή πληθώρας γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων σχετίζονται με την άμυνα (<u>Pathogenesis-related, PR</u>), φυτο-ορμονών και δευτερογενών μεταβολιτών, με απώτερο σκοπό την ανθεκτικότητα των φυτών στα παθογόνα (Bigeard et al., 2015; Gu et al., 2017).

Τα παθογόνα, μέσω των τελεστών, καταφέρνουν να μπλοκάρουν και να προσπεράσουν το PTI (βασική άμυνα) του ξενιστή. Η δράση αυτή των τελεστών προκαλεί τη λεγόμενη «Τελεστο-εξαρτώμενη ευαισθησία του ξενιστή» (Effector-triggered Susceptibility, ETS).

Στους ανθεκτικούς ξενιστές, εδώ ενεργοποιείται το τρίτο επίπεδο της άμυνας, που συγκεκριμένα αποτελεί το δεύτερο επίπεδο της έμφυτης ανοσίας. Στο επίπεδο αυτό κωδικοποιούνται πρωτεϊνικοί υποδοχείς άμυνας γνωστοί ως NLRs (NOD-like Receptors) που αναγνωρίζουν την παρουσία των τελεστών. Σε αυτή την περίπτωση, οι τελεστές ονομάζονται και αμολυσματικοί παράγοντες (avirulence, avr), καθώς δεν προκαλούν μόλυνση στους ξενιστές τους. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι XopJ4 (AvrXv4), XopH (AvrBs1.1), XopAG (AvrGf2), AvrXccC και AvrRxv (Timilsina et al., 2020). Οι NLRs αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με τους τελεστές, όπου τελικά επάγεται μία ειδική γραμμή άμυνας, που συχνά οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (<u>P</u>rogrammed <u>C</u>ell <u>D</u>eath, PCD). Στους φυτικούς οργανισμούς, η άμυνα που επάγεται μέσω των τελεστών ονομάζεται ETI (<u>E</u>ffector-<u>t</u>riggered <u>I</u>mmunity), και συχνά οδηγεί στην αντίδραση υπερευαισθησίας (<u>H</u>ypersensitive <u>R</u>esponse, HR), που αποτελεί μία μορφή PCD (Dangl and Jones, 2019; Duxbury et al., 2016; Mermigka and Sarris, 2019). Αντίθετα, στα θηλαστικά υπάρχουν δύο κατηγορίες PCD, η απόπτωση και η φλεγμονή, όπου οι NLRs δομούν αντίστοιχα τα μακρομοριακά σύμπλοκα αποπτοσώματα (apoptosomes) και φλεγμονοσώματα (inflammasomes) (Mermigka et al., 2020). Αντίστοιχα μακρομοριακά σύμπλοκα ανακαλύφθηκαν πολύ πρόσφατα και στους φυτικούς οργανισμούς, όπου ονομάζονται «ρεσιστοσώματα» (resistosomes) (Mermigka and Sarris, 2019; Mermigka et al., 2020; Wang et al., 2019a, 2019b) και τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω.

Αρχιτεκτονική των NLR υποδοχέων

Οι πρωτεΐνες αναγνώρισης των τελεστών ονομάζονται NLR (Nucleotidebinding domain and Leucine- rich Repeat-containing ή NOD-like Receptors) υποδοχείς. Αυτοί κωδικοποιούνται τόσο σε φυτά όσο και σε ζώα και είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Αποτελούν μέρος μίας κατηγορίας πρωτεϊνών που ονομάζονται STAND (Signal Transduction ATPases with Numerous Domains). To $\alpha \kappa \rho \omega \nu \delta \eta \lambda \omega \nu \epsilon$ ivat ένζυμα υδρόλυσης μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), που φέρουν πολλές επικράτειες στο μόριο τους έχοντας ρόλο ως μεταγωγείς σήματος (Leipe et al., 2004). Οι φυτικοί τυπικοί NLRs αποτελούνται από τρεις κύριες επικράτειες. Η κεντρική συντηρημένη επικράτεια τους είναι μία περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων με μία επικράτεια ARC (NB-ARC επικράτεια). Η επικράτεια αυτή έχει βρεθεί στον ανθρώπινο παράγοντα απόπτωσης ενεργοποίησης πρωτεάσης-1 [apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1)], σε πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (R proteins) και στην πρωτεΐνη θανάτου 4 του νηματώδους [Caenorhabditis elegans death-4 protein (CED4)] (van der Biezen and Jones, 1998). Η αντίστοιχη επικράτεια στα NLRs των θηλαστικών ονομάζεται NACHT, από τα αρχικά [NLR family apoptosis inhibitory protein (NAIP)], MHC class 2 transcription activator (CIITA), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*), and telomerase-associated protein (TP1)] (Koonin and Aravind, 2000). Ο ρόλος της κεντρικής αυτής περιοχής έγκειται στην ενεργοποίηση του NLR υποδοχέα τόσο των φυτών όσο και των θηλαστικών, μέσω ανταλλαγής της συνδεδεμένης διφωσφορικής αδενοσίνης (<u>A</u>denosine <u>D</u>i-<u>P</u>hosphatase, ADP) με ένα μόριο ATP, μεταβαίνοντας έτσι από την ανενεργή στην ενεργή κατάσταση (Sukarta et al., 2016). Στα φυτά, στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα υπάρχει στις περισσότερες περιπτώσεις μία επικράτεια από επαναλαμβανόμενα μοτίβα υδρόφοβων αμινοξέων, που συνήθως είναι αμινοξέα λευκίνης, τα οποία εναλλάσσονται με υδρόφιλα κατάλοιπα ((LxxLxLxxNxL), (LRR). Η περιοχή αυτή έχει προταθεί ότι συμμετέχει στην αυτό-αναστολή του υποδοχέα, διατηρώντας τον στην ανενεργή του κατάσταση, απουσία παθογόνου (Takken and Goverse, 2012; Takken et al., 2006). Επιπλέον, συμμετέχει στην αναγνώριση διαφόρων τελεστών (Jin and Lee, 2008; Zipfel, 2014).

Παλαιότερα, οι φυτικοί υποδοχείς, κατηγοριοποιούνταν ανάλογα με την αμινοτελική επικράτεια που φέρουν στο μόριο τους, στους TIR-NLRs ή TNLs [(Toll/interleukin1 receptor (TIR)] και στους CC-NLRs [Coiled Coil (CC)] ή CNLs (Meyers et al., 1999, 2003; Pan et al., 2000). Πλέον, οι NLRs χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τους TIR (TNLs) και τους non-TIR (nTNLs) υποδοχείς. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται κυρίως οι υποδογείς που φέρουν την επικράτεια CC ή την επικράτεια RPW8 στο αμινοτελικό τους άκρο (Barragan and Weigel; Kapos et al., 2019; Mermigka et al., 2020). Αντίστοιχα, οι NLRs των θηλαστικών μπορεί να φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο είτε μία επικράτεια στράτευσης κασπασών [caspase recruitment domain (CARD)], ή μία επικράτεια πυρινών [pyrin domain (PYD)], ή μία επικράτεια αναστολής της απόπτωσης [baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat (BIR)] (Εικ. 6). Οι επικράτειες που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο του υποδογέα άμυνας έχουν κύριο ρόλο στην σηματοδότηση της άμυνας (Fenyk et al., 2015), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν άμεσα με τελεστές των παθογόνων (Burch-Smith et al., 2007; Chen et al., 2012). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι συμμετέχουν και στο σχηματισμό του
NLR υποδοχέα, αποτελώντας το αρχικό ικρίωμα για τη δόμηση του ενεργού συμπλόκου NLR(s) (Cesari et al., 2014; Williams et al., 2014).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων επικρατειών των NLR υποδοχέων των φυτών και των θηλαστικών. Οι επικράτειες παρουσιάζονται με διάφορα χρώματα. Ακρωνύμια: BIR, Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat; CARD, caspase recruitment domain; CC, coiled coil domain; HD, helical domain; ID, integrated domain; LRR, leucine-rich repeat; NBD, nucleotide-binding domain; NLR, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat receptors; TIR, Toll/II-1 receptor; WHD, winged helix domain.

Μοντέλα αναγνώρισης τελεστών από τους NLR υποδοχείς

Έχουν προταθεί στην βιβλιογραφία διάφορα μοντέλα αναγνώρισης των τελεστών από τους NLR υποδοχείς, που περιλαμβάνουν την έμμεση ή την άμεση αναγνώριση. Έχουν επικρατήσει τέσσερα μοντέλα αναγνώρισης τόσο για τους φυτικούς όσο και τους ζωικούς υποδοχείς, τα οποία θα περιγραφούν στο σημείο αυτό και συνοψίζονται στην Εικ. 7.

Στο άμεσο μοντέλο αναγνώρισης και συγκεκριμένα στην "gene-for-gene" υπόθεση οι τελεστές, που αρχικά είχε αναφερθεί ότι κωδικοποιούνται από Avr γονίδια, αναγνωρίζονται άμεσα από NLR υποδοχείς του ξενιστή, που 37 κωδικοποιούνται από γονίδια ανθεκτικότητας (Resistance, R). Έχουν περιγραφεί αρκετά παραδείγματα άμεσης αναγνώρισης βακτηριακών και μυκητιακών τελεστών από NLR υποδοχείς, καθώς επίσης και τελεστών του ανθρώπου και του ποντικού (Duxbury et al., 2016). Για παράδειγμα, ο CNL υποδοχέας Pi-ta του ρυζιού αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά άμεσα με τον τελεστή Avr-Pita του μύκητα *Magnaporthe oryzae* (Jia et al., 2000). Αντίστοιχα, στον άνθρωπο και στον ποντικό, ο υποδοχέας NAIP2 αναγνωρίζει τον τελεστή της σαλμονέλας PrgJ μέσω άμεσης αναγνώρισης. Στη συνέχεια, ο υποδοχέας ολιγομερίζεται με τον υποδοχέα NLRC4, με σκοπό τη σηματοδότηση της άμυνας (Jeannette L. et al., 2014)

Στο έμμεσο μοντέλο αναγνώρισης, οι τελεστές των παθογόνων δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τους NLR υποδοχείς, αλλά με άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες του ξενιστή. Οι πρωτεϊνες αυτές ονομάζονται «φυλασσόμενες» πρωτεΐνες, καθώς οι NLR υποδοχείς λειτουργούν ως φύλακες τους, ανιγνεύοντας πιθανές τροποποίησεις σε αυτές, και οι οποίες προέργονται από τους τελεστές των παθογόνων (Μοντέλο του Φύλακα, «Guard/Guardee Model»). Ένα τέτοιο παράδειγμα έμμεσης αναγνώρισης αποτελεί η πρωτεΐνη του Arabidopsis RIN4 (RPM1 Interacting Protein 4), η οποία στοχεύεται από τέσσερις διαφορετικούς τελεστές της ψευδομονάδας και φυλάσσεται από δυο NLRs (Grant et al., 1995; Mackey et al., 2002). Σε μία παραλλαγή αυτού του μοντέλου έμμεσης αναγνώρισης (Μοντέλο του Δολώματος, «Decoy model»), η φυλασόμενη πρωτεΐνη που τροποποιείται από τη δράση των τελεστών, δεν έχει κάποιο άλλο λειτουργικό ρόλο μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, αλλά αποτελεί ένα «δόλωμα» για τους τελεστές, για την αναγνώριση και τη μετέπειτα σηματοδότηση της άμυνας (van der Hoorn and Kamoun, 2008). Ο υποδοχέας ZAR1 του Arabidopsis, αποτελεί ένα παράδειγμα επιτήρησης δολώματος και συγκεκριμένα κάποιων ψευδοκινασών, για τις οποίες δεν έχει βρεθεί κάποιος άλλος ρόλος τους μέσα στο κύτταρο, παρά μόνο να οδηγούν σε ενεργοποίηση της άμυνας, όταν ουριδινυλιωθούν από τελεστές της ξανθομονάδας (Wang et al., 2015).

Πρόσφατα, από τον επικεφαλή του εργαστηρίου και τους συνεργάτες του, ανακαλύφθηκε ένα νέο μοντέλο άμεσης αναγνώρισης των τελεστών από

NLR υποδοχείς, οι οποίοι, σε αυτή την περίπτωση δεν έχουν την τυπική αρχιτεκτονική που αναφέραμε προηγουμένως. Στο μοντέλο αυτό οι NLRs εμφανίζονται να έχουν ενσωματώσει στο μόριο τους μία επικράτειαδόλωμα (Integrated Decoy, ID) (Sarris et al., 2015, 2016). Συγκεκριμένα, ο NLR υποδοχέας RRS1 του Arabidopsis έχει ενσωματώσει στο καρβοξυτελικό του άκρο ένα πρωτεϊνικό μοτίβο τύπου WRKY, το οποίο εμφανίζει ομολογία με τους WRKY μεταγραφικούς παράγοντες των φυτών. Η αλληλεπίδραση με μοτίβο WRKY, διαφόρων τελεστών όπως του PopP2 της Ralstonia solanacearum και του AvrRps4 της Pseudomonas syringae, οδηγούν σε ενεργοποίηση του NLR και κατ' επέκταση σε ενεργοποίηση της άμυνας. Στην περίπτωση αυτή η σηματοδότηση της άμυνας διεκπεραιώνεται από έναν συνοδό NLR υποδοχέα, τον RPS4, με τον οποίο ο RRS1 δρα ως ζεύγος (Williams et al., 2014). Οι δύο αυτοί υποδοχείς αλληλεπιδρούν μέσω των αμινοτελικών TIR επικρατειών τους. Πρόσφατα, το μοντέλο αυτό που ανακαλύφθηκε πρώτα στα φυτά, επιβεβαιώθηκε ότι υπάρχει και σε NLR υποδοχείς των θηλαστικών (Daskalov et al., 2015; Sandstrom et al., 2019; Zhang et al., 2019). Για παράδειγμα, το βακτήριο Listeria monocytogenes, που προσβάλλει και τον άνθρωπο προκαλώντας την ασθένεια της λιστερίωσης, επάγει τον υποδογέα NLRX1 μέσω της πρόσδεσης στην ενσωματωμένη πρωτεϊνική επικράτεια LIR (LC3-Interacting Region).

Σε προηγούμενες μελέτες, έχουν βρεθεί ότι οι ενσωματωμένες πρωτεϊνικές επικράτειες (IDs) σε NLR υποδοχείς αλληλεπικαλύπτονται με διάφορους ελεύθερους στο κυτταρόπλασμα στόχους των παθογόνων (Sarris et al., 2016). Οι ενσωματώσεις αυτές είναι συντηρημένες σε διάφορες οικογένειες φυτικών NLRs και έχουν προκύψει ως ανεξάρτητο γεγονός σε κάθε οικογένεια, όπως συνέβη για το ID WRKY, που ομοιάζει με τους WRKY μεταγραφικούς παράγοντες (Sarris et al., 2016).

Τέλος, συχνά παρατηρείται το φαινόμενο οι NLR υποδοχείς να είναι γενετικά συνδεδεμένοι και να δρουν ως ζεύγος για την επαγωγή της αμυντικής απόκρισης. Αυτοί καλούνται συχνά ως βοηθητικοί ή μεταγωγείς NLRs (helper/transducer NLRs) (Duxbury et al., 2016). Ήδη αναφέρθηκε προηγουμένως, ότι ο NLR υποδοχέας RRS1 δρα σε ζεύγος με

τον γενετικά συνδεδεμένο υποδοχέα RPS4 στο Arabidopsis, όπου ο ένας αναγνωρίζει τους τελεστές και ο άλλος σηματοδοτεί την άμυνα, αντίστοιχα (Le Roux et al., 2015; Sarris et al., 2015). Στο ρύζι, αντίστοιχα το ζεύγος RGA4 και RGA5, που φέρουν CC επικράτεια στο αμινοτελικό τους άκρο, δρουν μαζί για την επιβολή της ανθεκτικότητας ενάντια στο μύκητα *M. oryzae* (Cesari et al., 2013; Okuyama et al., 2011). Επιπλέον, υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν για NLR υποδοχείς, μη γενετικά συνδεδεμένα, τα οποία όμως συνεργάζονται για την αναγνώριση των παραγόντων παθογένειας και τη σηματοδότηση της άμυνας. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι NLR υποδοχείς NRC3/NRC2a/NRC2b του είδους *Nicotiana benthamiana*, οι οποίοι δρουν συνεργατικά και είναι απαραίτητοι για την ανθεκτικότητα που διαμεσολαβείται μέσω της κινάσης Pto (Wu et al., 2016).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των NLR υποδοχέων φυτών και ζώων και παράλληλη παρουσίαση των διαφόρων μοντέλων αναγνώρισης των τελεστών από τους NLRs (Duxbury et al., 2016).

Ολιγομερισμός NLR υποδοχέων στα φυτά και στα ζώα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στα θηλαστικά κατά την απόκριση της άμυνας οι NLR υποδοχείς δημιουργούν ομο- και ετερο- πολυμερείς δομές, όπως τα «αποπτοσώματα» και τα «φλεγμονοσώματα», με αποτέλεσμα την επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση και φλεγμονή, αντίστοιχα). Η επαγωγή αυτή απαιτεί τη στρατολόγηση ειδικών κασπασών, που αποτελούν πρωτεάσες που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο. Λεπτομέρειες σχηματισμού των αποπτοσωμάτων και φλεγμονοσωμάτων περιγράφονται στην εικόνα 8.

Από τον επικεφαλή του εργαστηρίου μας είχε προταθεί η ύπαρξη αντίστοιχων δομών στους φυτικούς οργανισμούς (Duxbury et al., 2016), οποίες εντέλει ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και ονομάστηκαν 01 «ρεσιστοσώματα» (resistosomes) (Mermigka and Sarris, 2019; Mermigka et al., 2020; Wang et al., 2019a, 2019b). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δομή του ZAR1 υποδοχέα του Arabidopsis, ο οποίος φέρει στο καρβοξυτελικό του άκρο μία επικράτεια RKS1. Η καρβοξυτελική αυτή επικράτεια ανιχνεύει τον τελεστή ΧορΑC της ξανθομονάδας Χcc, που έχει δράση ουριδυλοτρανσφεράσης και τελικά ουριδυλιώνει την ψευδοκινάση PBL2 του φυτού. Αφού πραγματοποιηθεί η αναγνώριση του τελεστή και ενεργοποιηθεί ο υποδογέας μέσω ATP/ADP ανταλλαγής στη κεντρική NB-ARC επικράτεια, δημιουργείται ένα ετερο-πενταμερές, στο οποίο κάθε ακτίνα αποτελείται από τρία μόρια ZAR1/RKS1/PBL2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ακολουθεί, όμως, παραμένει άγνωστο (Εικ. 8).



Εικόνα 8. Απεικόνιση των μονοπατιών του APAF-1 αποπτοσώματος, του NLRC4/NAIP φλεγμονοσώματος και του φυτικού ZAR1 ρεσιστοσώματος. Ο σχηματισμός του αποπτοσώματος ενεργοποιείται από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια ως απάντηση σε ένα ερέθισμα που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Κατά την πρόσδεση της δεοξυ-αδενίνης και του κυτοχρώματος-c στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα, η κυτταροπλασματική μορφή του σχηματίζει ένα ολιγομερές του αποπτοσώματος. Η ενεργοποιημένη δομή, στη συνέχεια σχηματίζει το πλήρες επταμερές σύμπλοκο, με σχήμα «ρόδας», σε επταπλή στοιχειομετρική δομή. Ο σχηματισμός του φλεγμονοσώματος των

υποδοχέων NLRC4/NAIP5 ενεργοποιείται από την ανίχνευση του βακτηρίου στον περιβάλλοντα χώρο (π.χ. της φλαγγελίνης), η οποία ανιχνεύεται συγκεκριμένα από τον υποδοχέα ΝΑΙΡ5. Ως αποτέλεσμα, οι υποδοχείς ΝΑΙΡ σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον υποδοχέα NLRC4, οδηγώντας στο σχηματισμό μίας δομής σε σχήμα δίσκου με 11 μονομερή, παρόμοια με αυτής του αποπτοσώματος. Η ενεργοποίηση για το σχηματισμό του ZAR1 ρεσιστοσώματος πραγματοποιείται μέσω της ουριδυλίωσης της ψευδοκινάσης PBL2 από τον τελεστή της Xanthomonas campestris παθότυπου campestris, XopAC. Η ουριδυλιωμένη κινάση PBL2 (PBL2*) αναγνωρίζεται από το προσχηματισμένο κυτταροπλασματικό σύμπλοκο ZAR1/RSK1, οδηγώντας στην απελευθέρωση ενός ADP μορίου από τον ZAR1, με αποτέλεσμα να εκκινηθεί η διαδικασία, χωρίς όμως να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας ZAR1 σε αυτό το στάδιο. Η ενεργοποίηση φαίνεται πως είναι το αποτέλεσμα της πρόσδεσης ενός ΑΤΡ ή dATP μορίου στον υποδοχέα ZAR1 ως αντικατάσταση του ADP μορίου, οδηγώντας έτσι στον ολιγομερισμό του συμπλόκου ZAR1/RKS1/PBL2*. Τελικά αυτή η μεγαλύτερη δομή αποτελείται από ένα πενταμερές με ελικοειδές σχήμα στο κέντρο. Ακρωνύμια: APAF-1, Apoptotic protease-activating factor-1; BIR, baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat; CARD, caspase recruitment domain; CC, coiled coil domain; LRR, leucine-rich repeat; NAIP, NLR family apoptosis inhibitory protein; NBD, nucleotide-binding domain; NLR, nucleotidebinding domain and leucine-rich repeat receptors; PBL2, PBS1-LIKE PROTEIN 2; ZAR1, HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1 (Mermigka et al., 2020).

Το σύμπλοκο εξωκύττωσης

Η τελική θέση πολλών ευκαρυωτικών πρωτεϊνών είναι η πλασματική μεμβράνη ή ο αποπλαστικός/εξωκυτταρικός χώρος. Οι πρωτεΐνες αυτές καθώς εξέρχονται από το σύστημα Golgi εισέρχονται σε εξειδικευμένα εκκριτικά κυστίδια (vesicles), τα οποία θα εξωκυτταρωθούν μέσω της συμβατικής εκκριτικής οδού. Εναλλακτικά, κατά τη μη-συμβατική εκκριτική οδό, τα κυστίδια ενδέχεται να ενδοκυτωθούν σε μεγαλύτερες δομές που ονομάζονται πολύ-κυστιδιακές δομές (Multi-Vesicular Bodies, MVBs) και είτε να μεταφερθούν στην πλασματική μεμβράνη ή στον τονοπλάστη/λυσόσωμα προκειμένου να αποδομηθούν (Saeed et al., 2019; Žárský et al., 2013). Επιπλέον, εκτός από τα MVBs, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται προς αποδόμηση και μέσω των αυτοφαγοσωμάτων (Autophagosomes, ATG) (Εικ. 9). Συγκεκριμένα, στα φυτικά κύτταρα τα MVBs φέρουν μονή μεμβράνη, ενώ αντίθετα τα αυτοφαγοσώματα διπλή. Επιπλέον, ακόμη μία διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που θα εισέλθουν στα αυτοφαγοσώματα δεν περνούν από το σύστημα Golgi (trans-Golgi network, TGN), όπως συμβαίνει στο MVB εκκριτικό μονοπάτι, αλλά ακολουθούν το μονοπάτι της αυτοφαγίας προς αποικοδόμηση και ανακύκλωσή τους (Cui et al., 2018). Επιπλέον, στα φυτικά κύτταρα, έχει ανακαλυφθεί και μία τρίτη εκκριτική οδός, η οποία διαμεσολαβείται από τα οργανίδια EXPOs (<u>Exocyst-positive Organelles</u>), κατά την οποία το διπλής-μεμβράνης EXPO κυστίδιο συντήκεται με την πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνει το περιεχόμενό του στον αποπλαστικό χώρο (Saeed et al., 2019; Wang et al., 2010).



Εικόνα 9. Απεικόνιση των μονοπατιών ενδομεμβρανικής μεταφοράς, τα οποία συμπεριλαμβάνουν το σύμπλοκο εξωκύτωσης. Παρουσιάζονται τα δύο καθιερωμένα μονοπάτια: η εξωκύτωση των κυστιδίων που έχουν δημιουργηθεί στο trans-Golgi δίκτυο/ δίκτυο πρώιμων ενδοσωμάτων και το μονοπάτι μεταφοράς κυστιδίων στον τονοπλάστη του φυτικού κυττάρου (έντονα μαύρα βέλη). Παρουσιάζονται και άλλα πιθανά μονοπάτια εξωκύτωσης με διακεκομμένα μαύρα βέλη. Α: αυτοφαγοσώματα και διακίνηση πρωτεϊνών για αυτοφαγία ανεξάρτητα από το σύστημα Golgi, ER: ενδοπλασματικό δίκτυο, GA: Golgi, IVB: ενδοαυλικές δομές, MVB: πολύ-κυστιδιακές δομές, PM: πλασματική μεμβράνη, TGN/EE: trans-Golgi δίκτυο/ πρώιμα ενδοσώματα, TN: τονοπλάστης, V: χυμοτόπιο. Τα σύμπλοκα εξωκύτωσης που φέρουν διαφορετικές ισομορφές ΕΧΟ70 συμβολίζονται με τραπεζοειδές σχήμα και συνδέουν τα διάφορα φορτία με τις μεμβράνες-στόχους (Žárský et al., 2013).

Το σύμπλοκο εξωκύτωσης είναι ένα οκταμερές σύμπλοκο, το οποίο λαμβάνει μέρος στην εξωκύτωση κυστιδίων κατά τη συμβατική εκκριτική οδό, ενώ έχει προταθεί ότι συμμετέχει και στη μη συμβατική εκκριτική

οδό και στη βιογένεση των EXPOs, με τελικό στόχο τη μεταφορά τους στην πλασματική μεμβράνη, ή στον τονοπλάστη του φυτικού κυττάρου ή στα λυσοσώματα του ζωικού κυττάρου. Το σύμπλοκο εξωκύτωσης, αγκυροβολεί σε θέσεις ενεργούς εξωκυττάρωσης και επέκτασης της μεμβράνης. Το σύμπλοκο αυτό είναι συντηρημένο από τον άνθρωπο, στη ζύμη μέχρι και στα φυτά και δομείται από τις υπομονάδες SEC3, SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, EXO70 και EXO84. Ο ρόλος της εξωκύτωσης είναι να μεταφέρει μεμβρανικά στοιχεία στην πλασματική μεμβράνη, καθώς και ορμόνες ή στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος στον εξωκυτταρικό χώρο, για την ανάπτυξη του κυττάρου, την εφαρμογή κυτταρικής πολικότητας ή την κυτταρική διαίρεση, με απώτερο στόχο τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και ανάπτυξη των ιστών. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει τονιστεί η μεγάλη συμβολή του συμπλόκου εξωκύτωσης στην άμυνα, με τη μεταφορά αντιμικροβιακών ουσιών, αλλά και μεμβρανικών υποδοχέων που εμπλέκονται στην άμυνα, στη θέση προσβολής, περιορίζοντας τελικά την ανάπτυξη του παθογόνου (Martin-Urdiroz et al., 2016; Wang et al., 2020).

Η όλη διαδικασία της εξωκύτωσης περιλαμβάνει πέντε διακριτά στάδια: (1) τη δημιουργία ενός κυστιδίου (budding), (2) τη μεταφορά του κυστιδίου προς μία μεμβράνη-στόχο (transport), (3) την «επαφή» (tethering) με τη μεμβράνη στόχο, (4) την «στενή επαφή» (docking), τέλος (5) τη «σύντηξη» του κυστιδίου στην πλασματική μεμβράνη (fusion) (Εικ. 10) (Nishida-Fukuda, 2019; Saeed et al., 2019). Το σύμπλοκο εξωκύτωσης συμμετέχει σε όλα τα στάδια πλην του πρώτου, αλλά διαμεσολαβεί μόνο το τρίτο στάδιο, δηλαδή την «επαφή» του κυστιδίου με την πλασματική μεμβράνη. Στα υπόλοιπα στάδια απαιτούνται άλλες πρωτεΐνες, όπως πρωτεΐνες μεταφοράς (κυτταρικός σκελετός και GTPases, για παράδειγμα η SEC4) και πρωτεΐνες κυτταρικής σηματοδότησης και κυτταρικής σύντηξης (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNAREs). Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο εξωκύτωσης αποτελεί το μεσολαβητή στη γεφύρωση των πρωτεϊνών SNAREs, των δύο t-SNAREs στις δύο πλευρές της μεμβράνης και της v-SNARE του κυστιδίου (Εικ. 10) (Hong and Lev, 2014).



Εικόνα 10. Απεικόνιση των διαφόρων σταδίων από τη δημιουργία του κυστιδίου έως τη συγχώνευσή του με τη μεμβράνη στόχο. Η φωτογραφία είναι προσαροσμένη από τους (Nishida-Fukuda, 2019).

Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει προσπάθειες να ανακαλυφθεί η δομή του συμπλόκου εξωκύτωσης τόσο σε κύτταρα θηλαστικών, όσο και στη ζύμη. Παρόλα αυτά, στα φυτά παραμένει άγνωστο εάν το σύμπλοκο εξωκύτωσης λαμβάνει την ίδια ή διαφοροποιημένη δομή (Ahmed et al., 2018; Heider et al., 2016; Mei et al., 2018; Picco et al., 2017). Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο και στη ζύμη έχει δειχθεί ότι οι οκτώ υπομονάδες του συμπλόκου σχηματίζουν πρώτα δύο υπό-σύμπλοκα: το υπό-σύμπλοκο I (SC-I) που αποτελείται από τις υπομονάδες SEC3, SEC5, SEC6 και SEC8, και το υπό-σύμπλοκο ΙΙ (SC-II) που αποτελείται από τις υπομονάδες SEC10, SEC15, EXO70 και EXO84. Στα θηλαστικά, έγει δειχθεί ότι τα δύο αυτά υπό-σύμπλοκα έχουν την ικανότητα να συνδέονται με κυστίδια ανεξάρτητα και μπορούν να τα μεταφέρουν στην πλασματική μεμβράνη, γωρίς την αναγκαιότητα σγηματισμού πλήρους οκταμερούς συμπλόκου. Όμως, για να πραγματοποιηθεί η εξωκύτωση των κυστιδίων (πέμπτο στάδιο σύντηξης), απαιτείται η σύνδεση των δύο συνεργαζόμενων υπο-συμπλόκων σε ένα πλήρες λειτουργικό σύμπλοκο (Ahmed et al., 2018). Επιπλέον, έχει δειχθεί τόσο στη ζύμη, όσο και στα θηλαστικά, πως αρχικά δημιουργούνται τέσσερα ετεροδιμερή, αποτελούμενα από τα ακόλουθα ζεύγη, SEC3-SEC5, SEC6-SEC8, SEC10-SEC15, EXO70EXO84. Η σύνδεση των δύο υπό-συμπλόκων σε ένα λειτουργικό οκταμερές φαίνεται ότι διαμεσολαβείται μεταξύ των EXO70 και SEC5 υπομονάδων ενώ έχει προταθεί ο σχηματισμός διμερούς μεταξύ EXO70-SEC6 στη ζύμη.

Οι υπομονάδες SEC3 και ΕΧΟ70 προσδένονται στην πλασματική μεμβράνη και συγκεκριμένα στη 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλοινοσιτόλη (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, $PI(4,5)P_{2}$) που βρίσκεται στο εσωτερικό μέρος της πλασματικής μεμβράνης. Στην περίπτωση της υπομονάδας SEC3, η σύνδεση γίνεται μέσω της καρβοξυτελικής επικράτειας ΡΗ που φέρει και είναι εξελικτικά συντηρημένη. Αντίθετα, η ΕΧΟ70 συνδέεται στο φωσφολιπιδικό αυτό μόριο μέσω των θετικά φορτισμένων αμινοξέων, που φέρει στο καρβοξυτελικό της άκρο (Wu and Guo, 2015). Στη ζύμη, ο ταυτόχρονος διαγωρισμός και των δύο αυτών υπομονάδων του συμπλόκου εξωκύτωσης από την PI(4,5)P2 οδηγεί σε αποχωρισμό του συμπλόκου από τη μεμβράνη και αναστολή της εξωκύτωσης (He et al., 2007; Zhang et al., 2008). Στα φυτά, η πρώτη ένδειξη ότι η ΕΧΟ70 υπομονάδα του συμπλόκου αλληλεπιδρά με την πλασματική μεμβράνη, προήλθε από το μικρό μόριο ενδοσιδίνη-2 (ES2), το οποίο αναστέλλει την πρόσδεσή της στη μεμβράνη. Συγκεκριμένα, μετά από επίδραση με ES2 προκλήθηκε αποχωρισμός της EXO70A1 (μία εκ των 23 ισομορφών της EXO70 του Arabidopsis), από την πλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα, την αυξημένη μεταφορά της στο χυμοτόπιο προς αποδόμηση (Zhang et al., 2016).

Επιπρόσθετα, στα φυτικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί μία μεγάλη εξάπλωση όσον αφορά τα γονίδια exo70, ενώ στον άνθρωπο, στη Drosophila, στη ζύμη και στο νηματώδη υπάρχει μόνο ένα γονίδιο. Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε, στο είδος Arabidopsis thaliana υπάρχουν 23 παράλογα γονίδια, ενώ στο ρύζι υπάρχουν 47 παράλογα γονίδια (Elias et al., 2003). Στην εικόνα 11, φαίνονται οι διαφορετικοί εξελικτικοί κλάδοι των ΕΧΟ70 πρωτεϊνών στο Arabidopsis thaliana. Το γεγονός αυτό, έχει οδηγήσει στην διατύπωση αρκετών θεωριών, συμπεριλαμβανομένου ότι κάθε ισομορφή «προσδίδει» στο σύμπλοκο εξωκύτωσης μία συγκεκριμένη, διακριτή, λειτουργία ακόμη και μέσα στο ίδιο κύτταρο (Pečenková et al., 2017, 2020; Saeed et al., 2019). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως οι ισομορφές ΕΧΟ70Α1 και ΕΧΟ70Β1 του καπνού (Nicotiana tabacum) βρίσκονται σε δύο διακριτές και αμοιβαία αποκλειόμενες θέσεις στην πλασματική μεμβράνη του γυρεοσωλήνα (Sekereš et al., 2017). Στον πίνακα 3, συνοψίζονται οι κύριες λειτουργίες των 23 παράλογων γονιδίων exo70 της Arabidopsis thaliana. Επιπλέον, το γονιδίωμα του Arabidopsis κωδικοποιεί για δύο ομόλογα γονίδια sec3, sec5, που έχουν υψηλή ομολογία, επίσης για δύο παράλογα γονίδια sec15, καθώς και τρία παράλογα γονίδια exo84 (Elias et al., 2003).



Εικόνα 11. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών EXO70 στο Arabidopsis. (Stegmann et al., 2012).

Πίνακας 3. Απεικόνιση των ισομορφών ΕΧΟ70 στο Arabidopsis thaliana. Παρουσιάζεται η λειτουργία της κάθε ισομορφής.

Ισομορφές ΕΧΟ70	Λειτουργία			
EXO70A1	Εμπλοκή στην ανάπτυξη των τραχειακών στοιχείων (Li et al.,			
	2013) και στο σχηματισμό της κασπαριανής λωρίδας (Kalmbach et			
	al., 2017). Εμπλοκή στο βιοτικό στρες (Pečenková et al., 2020).			
EXO70A2	Εμπλοκή στη βλάστηση της γύρης και στην επιμήκυνση του			
	γυρεοσωλήνα (Beuder et al., 2020; Marković et al., 2019).			
EXO70A3	Ρύθμιση της αρχιτεκτονικής του ριζικού συστήματος (Ogura et al.,			
	2019).			
EXO70B1	Ρύθμιση της ομοιόστασης του υποδοχέα FLS2 στην πλασματική			
	μεμβράνη (Wang et al., 2020), αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη			
	RIN4, η οποία συμμετέχει στην άμυνα και συμμετοχή σε βιοτικές			
	αλληλεπιδράσεις (Redditt et al., 2019). Συμμετοχή στη ρύθμιση			
	του ανοίγματος των στομάτων (Seo et al., 2016), σε αμυντικές			
	αποκρίσεις και στον κυτταρικό θάνατο (Stegmann et al., 2014;			
	Zhao et al., 2015). Συμμετοχή στην αυτοφαγία (Kulich et al.,			
	2013).			
EXO70B2	Ρύθμιση της ομοιόστασης του υποδοχέα FLS2 στην πλασματική			
	μεμβράνη (Wang et al., 2020), συμμετοχή σε αμυντικές			
	αποκρίσεις έναντι διαφόρων παθογόνων (Peenková et al., 2011;			
	Stegmann et al., 2012).			
EXO/0C1	Συμμετοχή στην ανάπτυξη της γύρης (Li et al., 2010; Synek et al.,			
	2017).			
EXO/0C2	Συμμετοχή στην ανάπτυξη της γύρης (Synek et al., 2017).			
EXO70D1	Συμμετοχή στην αυτοφαγία πρωτεϊνών τύπου ARR για τη ρύθμιση			
ENOTODA	της ευαισθησιας σε κυτοκινες (Acheampong et al., 2020).			
EXO/0D2	Συμμετοχή στην αυτοφαγία πρωτείνων τυπου ARR για τη ρυθμίση			
EV070D2	της ευαισθησιας σε κυτοκινες (Acheampong et al., 2020).			
EXO/0D3	Συμμετοχή στην αυτοφαγία πρωτείνων τυπου ARR για τη ρυθμίση			
EX070E1	tης ευαισθησιας σε κυτοκινες (Acheampong et al., 2020).			
EXO/0E1	Αλληλεπιοραση με τη ΚΙΝ4,η οποία εμπλεκεται στην αμυνα			
EXO70E2	(Redulit et al., 2017). Semugration for the state of the			
EA070E2	2χ i puttopos two EXFOS (Ding et al., 2014, wang et al., 2010),			
	αλληλελιορμοη με τη Κηντ που συμμετεχει στην αμονά και			
	(Redditt et al. 2019)			
FX070F1	(Redditt et al., 2017). A)) η ξ π (δ α σ η μ ξ π η $RIN4$ π ω) σ ω ω ξ π η ω ω α (Redditt et			
	al 2019) Of $\alpha \theta \theta \lambda \alpha \kappa c$ $\pi \alpha \omega \tau \epsilon^{2} \kappa c$ to $\omega t \alpha \omega \kappa c$ (Reduit et			
	EXO70F3 commercial structure from α (Fujisaki et al. 2015). The tal			
	2015), όπως επίσης και η ορθόλογη πρωτεΐνη από το κοιθάοι			
	(Ostertag et al., 2013).			
EXO70G1	-			
EXO70G2	-			
EXO70H1	Συμμετογή στην άμυνα έναντι παθογόνων (Peenková et al., 2011).			
EXO70H2	Πιθανή ρύθμιση στην ομοιόσταση του σιδήρου (Xing et al., 2015).			
EXO70H3	-			
EXO70H4	Εμπλοκή στην έκκριση της συνθάσης καλλόζης (Kulich et al			
	2018), στην ωρίμανση του κυτταρικού τοινώματος του τρινώματος			
	(Kulich et al., 2015), όπως επίσης και στην άμυνα μέσω ρύθμισης			

	του κλεισίματος των στομάτων και της έκκρισης καλλόζης (Oblessuc et al., 2020).
EXO70H5	-
EXO70H6	-
EXO70H7	-
EXO70H8	-

Εμπλοκή του συμπλόκου εζωκύτωσης στην άμυνα.

Το σύμπλοκο εξωκύτωσης, εκτός από τη συνεισφορά στη φυσιολογία και την ομοιόσταση του ευκαρυωτικού κυττάρου, αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του αμυντικού μηχανισμού φυτών και ζώων (Martin-Urdiroz et al., 2016). Συγκεκριμένα, στα φυτικά κύτταρα, το σύμπλοκο εξωκύτωσης συμμετέχει ενεργά στη βασική άμυνα (PTI), με τη μεταφορά αμυντικών πρωτεϊνών και μεταβολιτών με αντιμικροβιακές ιδιότητες στον αποπλαστικό χώρο. Επιπρόσθετα, το σύμπλοκο αυτό διαμεσολαβεί τη μεταφορά και εναπόθεση καλλόζης, για την ισχυροποίηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, στις θέσεις προσβολής από τον παθογόνο μικροοργανισμό (Εικ. 12) (Gu et al., 2017; Wang et al., 2016). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι κατά την άμυνα έναντι παθογόνων ενδέχεται να αλλάζει η πορεία της μη-συμβατικής εκκριτικής οδού. Συγκεκριμένα οι πολύκυστιδιακές δομές (MVBs) και τα αυτοφαγοσώματα (ATG) αλλάζουν τον τελικό τους στόχο και εκκρίνουν πλέον το περιεχόμενό τους έξω από την πλασματική μεμβράνη, στοχεύοντας στις θέσεις προσβολής από τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Bozkurt et al., 2015; Contento and Bassham, 2012; Pečenková et al., 2017). Επομένως, οι διάφορες εκκριτικές οδοί, με τα διάφορα συστατικά που τις απαρτίζουν, θεωρούνται εύλογοι στόχοι των διαφόρων τελεστών των παθογόνων, με σκοπό να καταστείλουν τη φυτική άμυνα.

Στα φυτικά κύτταρα, στο συμβατικό μονοπάτι έκκρισης, το trans-Golgi δίκτυο, που αποτελεί τη θέση δημιουργίας των εκκριτικών κυστιδίων, αποτελεί ταυτόχρονα και το σημείο διαχωρισμού, όπου οι πρωτεΐνες είτε θα μεταφερθούν προς έκκριση στον αποπλαστικό χώρο είτε θα αποδομηθούν στο χυμοτόπιο (Dettmer et al., 2006; Viotti et al., 2010). Με το μονοπάτι αυτό εκκρίνονται πολλές πρωτεΐνες, που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην άμυνα έναντι φυτοπαθογόνων και οι ίδιες ή οι ρυθμιστές τους αποτελούν στόχους των τελεστών των φυτοπαθογόνων (Gu and

Innes, 2012). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη-ρυθμιστής της εξωκυττάρωσης της PR1 (Pathogenesis-Related Protein 1) πρωτεΐνης, η πρωτεΐνη KEGG (Keep on Going), στοχεύεται και αποδομείται από το μύκητα Golovinomyces cichoracearum, ύστερα από την ωρίμανση του μυζητήρα (haustorium). Έτσι, ο μύκητας με αυτή τη στρατηγική παρεμποδίζει την έκκριση της PR1 στον εξωκυττάριο χώρο και ευνοεί την περαιτέρω ανάπτυξη του μύκητα. (Gu and Innes, 2012). Επιπλέον, η πρωτεΐνη του εμπλέκεται στην άμυνα **RPW8.2** Arabidopsis ενάντια σε μη προσαρμοσμένους μύκητες που προκαλείται από ωίδια. Συγκεκριμένα, μετατοπίζεται στη μεμβράνη, όπου σγηματίζεται ο μυζητήρας του μύκητα (Wang et al., 2009). Η μετατόπιση γίνεται μέσω του συμβατικού εκκριτικού μονοπατιού TGN/EE με τη βοήθεια της πρωτεΐνης VAMP721/722, που ανήκει στην οικογένεια των SNARE πρωτεϊνών (Asaoka et al., 2013; Kim et al., 2014). Επιπλέον, σε δύο περιπτώσεις, έχει δειχθεί πως οι ίδιες οι πρωτεΐνες του συμπλόκου εξωκύτωσης αποτελούν άμεσο στόχο των τελεστών των φυτοπαθογόνων. Ο ωομύκητας Phytopthora infestans εκκρίνει μεταξύ άλλων τελεστών της οικογένειας RXLR (που φέρουν δηλαδή επικράτειες RXLR), τον τελεστή AVR1, ο οποίος βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της υπομονάδας SEC5 του συμπλόκου εξωκύτωσης. Η τελευταία, εμπλέκεται άμεσα στη μεταφορά της PR1 πρωτεΐνης-άμυνας και της καλλόζης στον εξωκυτταρικό χώρο, με αποτέλεσμα η στόχευση της από τον ωομυκητιακό τελεστή να συνδέεται με πιθανή παρεμπόδιση της κυστιδιακής μεταφοράς και εν τέλει καταστολή της βασικής άμυνας του φυτού (Du et al., 2015). Επιπλέον, πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι οι ισομορφές ΕΧΟ70Β1 και EXO70B2 του Arabidopsis ρυθμίζουν τη μεταφορά και ομοιόσταση του διαμεμβρανικού PRR υποδογέα FLS2, στην πλασματική μεμβράνη. Ο υποδοχέας αυτός είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση ενός ολιγοπεπτιδίου 22 αμινοξέων της φλαγγελίνης (flg22) του μαστιγίου των βακτηρίων, στα φυτικά κύτταρα και επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι της βασικής άμυνας (Wang et al., 2020). Από την ίδια ερευνητική ομάδα είχε ανακαλυφθεί επίσης ότι η EXO70B1 του Arabidopsis στοχεύεται και αποδομείται από τον τελεστή της ψευδομονάδας AvrPtoB. Ο τελεστής αυτός έχει δράση E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, ο οποίος εξαρτάται με το μη-τυπικό NLR υποδοχέα TN2 (Wang et al., 2019c). Ο υποδοχέας αυτός αποτελεί το «φύλακα» της EXO70B1 στο Arabidopsis,

ενώ απουσία της «φυλασσόμενης» EXO70B1 ενεργοποιείται και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Wang et al., 2019c; Zhao et al., 2015).

To δεύτερο μη-συμβατικό μονοπάτι έκκρισης περιλαμβάνει τις πολυκυστιδιακές δομές (MVBs) (Εικ. 12). Οι δομές αυτές, όπως αναφέραμε προηγουμένως, κατά την προσβολή από παθογόνα ενδέχεται να «αλλάζουν» την πορεία της έκκρισής τους από το χυμοτόπιο προς την πλασματική μεμβράνη. Οι δομές αυτές πιθανόν να εμπλέκουν κατά την έκκρισή τους το σύμπλοκο εξωκύτωσης (Saeed et al., 2019). Είχε προταθεί πως ανάμεσα στα φορτία τους συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην άμυνα, ενώ κατά την προσβολή του κριθαριού από μύκητες επάγεται συσσώρευση εξωσωμάτων (An et al., 2006b, 2006a). Εδώ θα πρέπει να αναφέρουμε ότι τα κυστίδια τα οποία εξωκυτταρώνονται ονομάζονται εξωσώματα. Αυτά συνήθως προκύπτουν από την σύντηξη των MVBs στην πλασματική μεμβράνη και έχουν παρατηρηθεί τόσο σε ζωικά όσο και σε φυτικά κύτταρα (An et al., 2007; Février and Raposo, 2004; Simons and Raposo, 2009). Η συσσώρευση εξωσωμάτων επιβεβαιώθηκε αργότερα και μετά από βακτηριακή προσβολή. Συγκεκριμένα, μόλυνση του Arabidopsis από το βακτήριο Pst οδήγησε στη βιογένεση MVBs και μεμβρανικών κυστιδίων που ομοιάζουν με τα εξωσώματα (Wang et al., 2014). Την επόμενη χρονιά οι (Bozkurt et al., 2015) έδειξαν πως μετά από μόλυνση του φυτού N. benthamiana από το μύκητα P. infestans η πορεία μετακίνησης των ώριμων ενδοσωμάτων άλλαξε από το χυμοτόπιο προς την πλασματική μεμβράνη, στο σημείο σγηματισμού του μυζητήρα, όπου συσσωρεύθηκαν διάφορες RLKs που σχετίζονται με την άμυνα.

Τέλος, έχει ανακαλυφθεί από τους (Wang et al., 2010) ένα ακόμη οργανίδιο, το EXPO (Exocyst-Positive organelle) που αποτελεί μία εκκριτική οδός φορτίων που εμπλέκονται στην άμυνα (Eικ. 12) (Gu et al., 2017). Τα οργανίδια αυτά, που περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη, είναι διακριτά από τα κυστίδια που συμμετέχουν στα εκκριτικά μονοπάτια TGN/EE και MVB και η ισομορφή EXO70E2 της Arabidospis εντοπίζεται και στις μεμβράνες των οργανιδίων αυτών. Η πρωτεΐνη αυτή του συμπλόκου εξωκύτωσης είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των οργανιδίων EXPOs και χωρίς αυτή δε μπορούν να προσέλθουν οι άλλες υπομονάδες του συμπλόκου (Ding et al., 2014). Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, χωρίς σινιάλο έκκρισης, όπως η SAMS2, εισέρχονται στα EXPOs και εξωκυτταρώνονται, καθώς δε μπορούν να εισέλθουν σε κυστίδια του κλασσικού εκκριτικού μονοπατιού (Wang et al., 2010).



Εικόνα 12. Μεμβρανική μετακίνηση κατά τη διάρκεια των φυτικών ανοσολογικών αντιδράσεων. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην άμυνα συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και μεταφέρονται μέσω του συστήματος Golgi στον κόμβο διαλογής του δικτύου trans-Golgi/πρώιμων ενδοσωμάτων (TGN / EE). Τα κυστίδια που προέργονται από το TGN / ΕΕ, συμπεριλαμβανομένων και των πολυκυστιδιακών δομών (MVBs), συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη ή με την μεμβράνη εσωτερικά της δομής του μυζητήρα (haustorium) (PM / EHM) για να εκκρίνουν τα διαλυτά φορτία τους στον εξωκυτταρικό χώρο και τα μεμβρανικά φορτία τους στις τελικές θέσεις PM / EHM. Τα κυστίδια MVBs και EXPOs συμβάλλουν στη συσσώρευση εξωσωμάτων, των οποίων η μεμβράνη θα διανοιχθεί στον εξωκυτταρικό χώρο και θα εκκριθεί το περιεχόμενο τους, συμπεριλαμβανομένου και μορίων με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι τελεστές που εκκρίνονται από τα παθογόνα στα κύτταρα του ξενιστή αναστέλλουν πολλαπλά στάδια των εκκριτικών οδών μετακίνησης, με σκοπό την καταστολή της ενεργοποίησης της άμυνας. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, που εντοπίζονται στην PM και σχετίζονται με την άμυνα, όπως οι PRRs, υφίστανται συνεχώς ενδοκύτωση πριν από την ενεργοποίησή τους, δηλαδή απουσία παθογόνου μικροοργανισμού. Μόλις ενεργοποιηθούν όμως από την ύπαρξη ενός προσδέτη, αυτοί οι υποδοχείς ενσωματώνονται σε κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη (Clathrin-Coated vesicles, CCVs) και υφίστανται ενδοκυττάρωση που διαμεσολαβείται μέσω της κλαθρίνης (Clathrin-mediated endocytosis,

CME). Η ενδοκυτταρική αυτή οδός ταξινομεί τους ενεργοποιημένους υποδοχείς στο κεντρικό χυμοτόπιο μέσω των μονοπατιών έκκρισης TGN / EEs και MVB. Τόσο η συστατική ενδοκύτωση όσο και η ενδοκυττάρωση που διαμεσολαβείται από την κλαθρίνη συμβάλλουν στη βασική ανοσία και στοχεύονται από παθογόνους παράγοντες. Τα βέλη δείχνουν τα βήματα των εκκριτικών (πράσινα βέλη) και των ενδοκυτταρικών (κόκκινα βέλη) οδών (Gu et al., 2017).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας, στο παρόν κεφάλαιο της Διδκτορικής Διατριβής, είναι η εύρεση νέων αλληλεπιδράσεων μεταξύ συντηρημένων και μη-, τελεστών Xanthomonas των βακτηρίων campestris, Ralstonia solanacearum και Pseudomonas syringae, με φυτικές επικράτειες που βρέθηκαν ενσωματωμένες σε NLR υποδοχείς (Integrated Decoys, IDs). Οι ID επικράτειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλείο για την μετέπειτα εύρεση των πραγματικών πρωτεϊνικών στόχων των τελεστών στο κύτταρο-ξενιστή. Αφού, όπως αναφέραμε και όπως έχει προταθεί στην βιβλιογραφία, οι ID επικράτειες των NLRs αποτελούν δολώματα που ομοιάζουν με τις πραγματικές πρωτεΐνες-στόχους κατά την εκβαση της παθογένειας. Θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα από τα πειράματα δοκιμασίας των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα και οι νέες αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν.

Στη συνέχεια, θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα εξεύρεσης του πραγματικού στόχου ενός από τους τελεστές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή, τον οποίο επιλέξαμε να μελετήσουμε εις βάθος. Διερευνήσαμε επίσης τις φυσιολογικές αλλαγές που προκαλεί στο κύτταρο – ξενιστή, καθώς επίσης αναζητήσαμε το μοριακό μηχανισμό με τον οποίο χειραγωγεί τον/τους στόχους του. Τέλος, αναπτύξαμε μία υπόθεση για την παθογένεια στην οποία ο τελεστής καταστέλλει τον υποκυτταρικό στόχο στο κύτταρο του ξενιστή, αποφεύγοντας να ενεργοποιεί την άμυνα του ξενιστή.

Αποτελέσματα

I. Μελέτη αλληλεπίδρασης συντηρημένων βακτηριακών παραγόντων παθογένειας της Ξανθομονάδας με πρωτεϊνικάδολώματα ενσωματωμένα σε υποδοχείς NLR του ζενιστή.

Στην παρούσα διδακτορική μελέτη, εξετάστηκαν συντηρημένοι και μη τελεστές παθογένειας (effectors) του βακτηριακού είδους Xanthomonas campestris παθοτύπου (pv.) campestris, με σκοπό την εύρεση στόχων στα κύτταρα του ξενιστή. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε μία μεγάλη ομάδα από πρωτεϊνικές επικράτειες-δολώματα (Integrated Decoys, IDs), οι οποίες βρέθηκαν ενσωματωμένες σε NLR υποδοχείς άμυνας. Ο ρόλος αυτών των IDs είναι να αποτελούν «δολώματα» για τους βακτηριακούς τελεστές, χωρίς προς το παρός να έχει βρεθεί ή αποκλεισθεί η εμπλοκή τους σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες στα κύτταρα του ξενιστή (Sarris et al., 2015, 2016). Οι βακτηριακοί τελεστές, καθώς και οι επικράτειες-IDs, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, συνοψίζονται στον Πίνακα 4. Εξετάσαμε όλες τις δυνητικές αλληλεπιδράσεις των βακτηριακών τελεστών με τα IDs με τη χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Yeast-Two-Hybrid, Y2H), ως μία πρώτη και γρήγορη ένδειξη αλληλεπίδρασης.

Πίνακας 4. Σύνοψη των βακτηριακών εκκρινόμενων πρωτεϊνών παθογένειας (τελεστών) και των φυτικών πρωτεϊνικών επικρατειών - συγχωνευμένων σε υποδοχείς άμυνας (IDs), που μελετήθηκαν στην παρούσα ΔΔ.

	Βακτηριακοί Τελεστές	Είδος ποοέλευσης	Φυτικές ενσωματωμένες	Είδος προέλευσης
	10,00105	whoevergelie	επικράτειες-	
			δολώματα	
1	AvrBs2	Xanthomonas	B3	Μονοκότυλο
		<i>campestris</i> pv.		
		campestris (Xcc)		
2	ХорК	Xcc	CG	Μονοκότυλο
3	XopL	Xcc	Exo70	Μονοκότυλο
4	XopN	Xcc	HSF	Μονοκότυλο
5	XopP	Xcc	Kinase-C	Μονοκότυλο
			(YRD/DFG)	
6	XopQ	Xcc	Kinase-N (C-010)	Μονοκότυλο
7	XopR	Xcc	Kinase-N (C153)	Μονοκότυλο
8	XopPX1	Xcc	PP2C	Μονοκότυλο
9	XopPX2	Xcc	TRX_C	Μονοκότυλο

10	XopZ	Xcc	WRKY_C	Μονοκότυλο
11	ХорО	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Xcv)	ZFBED_N_C045	Μονοκότυλο
12	XopS	Xcv	ZFBED_N_C350	Μονοκότυλο
13	PopP2	Ralstonia solanacearum (Rs)	WRKY	Μονοκότυλο
14	AvrRps4	Pseudomonas syringae pv. pisi (Psp)	WRKY_RRS1	Δικότυλο
15			HMA	Δικότυλο
16			ТСР	Δικότυλο
17			LIM	Δικότυλο
18			U-Box	Δικότυλο
19			TFSIIN	Δικότυλο
20			ZnF_C3H1	Δικότυλο
21			TIR	Δικότυλο

Αρχικά, ενισχύθηκαν τα υπό μελέτη γονίδια μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης για τη ζύμη, μέσω του συστήματος Golden Gate (Engler et al., 2008). Συγκεκριμένα, οι βακτηριακοί τελεστές κλωνοποιήθηκαν ως «θηράματα» (preys) καρβοξυτελικά και στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο της επικράτειας ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα της γαλακτοσιδάσης (Gal4 Activation Domain, AD) στον πλασμιδιακό φορέα pGADT7. Ενώ τα IDs κλωνοποιήθηκαν ως «δολώματα» καρβοξυτελικά της επικράτειας πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα της γαλακτοσιδάσης (Gal4 DNA Binding Domain, DBD) στον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές μέσω αλληλούχισης κατά Sanger, για την ορθότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης στα σημεία της σύντηξης. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι στον έλεγγο αυτό βρήκαμε μία ανακριβή αλληλουχία ενός ID, το οποίο και τελικά δε συμπεριλάβαμε στον Πίνακα 4 και στη μελέτη μας, καθώς υπήρχε λάθος στο πρωτογενές πλασμίδιο, από το οποίο και προσπαθήσαμε να ενισχύσουμε μέσω PCR το ID (Calmodulin binding protein/Kinase C). Ακολούθως, προχωρήσαμε στους μετασχηματισμούς του στελέχους ζύμης PJ69 και εν συνεχεία ελέγξαμε για τυχόν αυτό-ενεργοποίηση της μεταγραφής από μεμονωμένες

πλασμιδιακές κατασκευές (Gal4-DBD-IDs). Με αυτό τον τρόπο αποκλείσαμε πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Κύτταρα ζυμομύκητα του στελέχους PJ69 μεταγηματίστηκαν με όλα τα ζεύγη ενός ID (Gal4-DBD-ID) και Gal4-AD-άδειο φορέα. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε τυχόν αλληλεπίδραση σε φτωχό θρεπτικό μέσο, από το οποίο απουσίαζε η λευκίνη και η τρυπτοφάνη και προστέθηκε X-gal, το χρωμογόνο υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης, που μετατρέπει τη ζύμη από λευκή σε μπλε όταν σε αυτήν γίνεται επαγωγή του GAL4, δηλαδή όταν αλληλεπιδρούν δύο υπό μελέτη πρωτεϊνες υπάρξει ń όταν αυτοενεργοποίηση.

Από τα αποτελέσματά μας δε φάνηκε αυτό-ενεργοποίηση (λευκό χρώμα), παρά μόνο για την περίπτωση του *Hvv*WRKY (μπλε χρώμα), το οποίο ελέγχθηκε στη συνέχεια σε φτωχό θρεπτικό μέσο, από το οποίο απουσίαζε η λευκίνη, η τρυπτοφάνη και η αδενίνη (εικόνα 13 και εικόνα 14). Στο θρεπτικό μέσο αυτό, το ID δεν εμφάνισε ικανότητα αυτό-ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου αναφοράς (αδενίνη).



Εικόνα 13. Απεικόνιση αποτελεσμάτων πιθανής αυτό-ενεργοποίησης των φυτικών IDs, συγχωνευμένων με την επικράτεια Gal4-DBD. Οι ζύμες μεγάλωσαν σε φτωχό θρεπτικό μέσο, όπου απουσίαζαν τα αμινοξέα λευκίνη (L) και τρυπτοφάνη (W) και υπήρχε το χρωμογόνο υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης, X-gal σε συγκέντρωση 0,08 mg/mL. Ως θετικός μάρτυρας ελέγχου (μπλε χρώμα) χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος WRKY ID από το Arabidopsis thaliana και AvrRps4 από την Ψευδομονάδα P.syringae pv. pisi και ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, οι άδειοι φορείς (λευκό χρώμα).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί (δυαδικοί μετασχηματισμοί) στη ζύμη. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 280 αρχικοί μετασχηματισμοί ελέγχου όπου ελέγχθηκαν οι αλληλεπιδράσεις με το γονίδιο αναφοράς αυξοτροφίας αδενίνης. Στην εικόνα 13, παρατηρούνται συνολικά όλες οι θετικές αλληλεπιδράσεις, ενώ κάθε θετική

αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε με δύο ακόμη βιολογικές επαναλήψεις με πανομοιότυπα αποτελέσματα.



Εικόνα 14. Απεικόνιση όλων των θετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτικών IDs και βακτηριακών τελεστών της ξανθομονάδας ή των ειδών *Ralstonia solanacearum* και *Pseudomonas syringae*, σε δοκιμασία των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Η επιλογή πραγματοποιήθηκε σε φτωχό θρεπτικό μέσο, όπου έλειπαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A) (-LWA).

Στη συνέχεια, επιλέξαμε να μελετήσουμε εκτενέστερα το ζεύγος αλληλεπίδρασης Exo70-XccXopP, καθώς ο συγκεκριμένος τελεστής αποτελεί έναν από τους τρεις συντηρημένους τελεστές όλων των ειδών του γένους Xanthomonas. Επίσης κατά την περίοδο ανακάλυψης αυτής της αλληλεπίδρασης δεν υπήρχε στην βιβλιογραφία κανένας γνωστός τελεστής που να στοχεύει την Exo70. Σε επανάληψη της δοκιμασίας του Y2H με διαδοχικές αραιώσεις, της μετασχηματισμένης με το συγκεκριμένο ζεύγος ζύμης, έγινε εμφανής η πολύ ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών (Εικ. 15).



Εικόνα 15. Απεικόνιση διαδοχικών αραιώσεων της μετασχηματισμένης με το ζεύγος Εχο70 ID-*Xcc*XopP ζύμης και των διαφόρων μαρτύρων ελέγχου και ανάπτυξη τους σε φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσιάζουν τα στοιχεία λευκίνη (L), η τρυπτοφάνη (W) (αριστερά) και τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A) (δεξιά). Σε αυξοτροφία αδενίνης, μεγάλωσαν μόνο το ζεύγος Εχο70 ID-*Xcc*XopP και ο θετικός μάρτυρας ελέγχου.

II. Εύρεση του πραγματικού στόχου του τελεστή XccXopP στο κύτταρο του ζενιστή και ανάλυση της αλληλεπίδρασής τους.

Η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του Exo70 ID και του βακτηριακού τελεστή *Xcc*XopP υποδηλώνει ότι πιθανόν ο συγκεκριμένος τελεστής στοχεύει μέσα στο φυτικό κύτταρο πρωτεΐνες με ομολογία ως προς το συγκεκριμένο ID (Sarris et al., 2015, 2016). Για να βρούμε τον πραγματικό στόχο του *Xcc*XopP, ελέγξαμε την πρωτεϊνική ομολογία του Exo70-ID με BLASTP στην βάση δεδομένων NCBI και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 16. Για λόγους παρουσίασης, απεικονίζεται μόνο ένα μέρος των αποτελεσμάτων, παρόλα αυτά τα αποτελέσματα περιορίστηκαν κυρίως στην EXO70B1 φυτική πρωτεΐνη, τόσο από δικότυλα όσο και από μονοκότυλα φυτικά είδη.

		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	RGA2a [Aegilops tauschii]	1152	1152	97%	0.0	80%	AGQ17376.1
	Disease resistance RPP13-like protein 4 [Triticum urartu]	989	989	97%	0.0	73%	EMS50304.1
63	unnamed protein product [Triticum aestivum]	834	834	81%	0.0	72%	CDM85758.1
	exocyst complex component EXO70B1-like [Aegilops tauschii subsp. tauschii]	830	830	81%	0.0	72%	XP 020170025.1
	exocyst complex component EXO70B1 [Brachypodium distachyon]	810	810	80%	0.0	71%	XP 003564951.1
	PREDICTED: exocyst complex component EXO70B1-like [Oryza brachyantha]	709	709	81%	0.0	66%	XP 006645246.1
	Exocyst complex component EXO70A1 [Zea mays]	708	708	80%	0.0	64%	PWZ09976.1
	exocyst complex component EX070B1 [Sorghum bicolor]	708	708	80%	0.0	66%	XP 002456856.1
	exocyst complex component EXO70B1-like [Panicum miliaceum]	707	707	79%	0.0	67%	RLN24838.1
	exocyst complex component EXO70B1 [Zea mays]	706	706	80%	0.0	64%	XP 008656930.2
	exocyst complex component EXO70B1 [Setaria italica]	705	705	79%	0.0	66%	XP 004971086.1
	exocyst complex component EX070B1-like [Panicum hallii]	704	704	79%	0.0	66%	XP 025814971.1
	hypothetical protein C2845 PM13G17580 [Panicum miliaceum]	699	699	79%	0.0	66%	RLN04685.1
	hypothetical protein GQ55_5G038400 [Panicum hallii var. hallii]	697	697	79%	0.0	66%	PUZ53249.1
	uncharacterized protein LOC100274743 [Zea mays]	697	697	79%	0.0	64%	NP 001347579.1
8	exocyst complex component EXO70B1 [Oryza sativa Japonica Group]	696	696	79%	0.0	66%	XP 015616053.1
	Exocyst complex component EXO70A1 [Dichanthelium oligosanthes]	692	692	79%	0.0	66%	OEL36798.1
	hypothetical protein Osl 04970 [Oryza sativa Indica Group]	678	678	73%	0.0	67%	EEC72058.1
	predicted protein (Hordeum vulgare subsp. vulgare)	676	676	67%	0.0	70%	BAK06848.1
	putative EXO70-G1 protein [Oryza sativa Japonica Group]	676	676	73%	0.0	67%	BAD88371.1
	Exocyst complex component 7 [Triticum urartu]	670	670	66%	0.0	71%	EMS57716.1
	PREDICTED: exocyst complex component EXO70B1 [Nelumbo nucifera]	513	513	80%	3e-170	47%	XP 010250741.1
	exocyst complex component EXO70B1-like isoform X1 [Ananas comosus]	513	513	79%	1e-169	48%	XP 020097078.1
	Exocyst complex component EXO70B1 [Ananas comosus]	512	512	79%	6e-169	49%	OAY72678.1
	PREDICTED: exocyst complex component EXO70B1-like [Elaeis guineensis]	508	508	83%	3e-168	48%	XP 010929780.1
	Exocyst complex component EXO70B1 [Ananas comosus]	508	508	76%	6e-168	50%	OAY86079.1
	exocyst complex component EXO70A1-like [Ananas comosus]	508	508	76%	9e-168	51%	XP 020089240.1
	PREDICTED: exocyst complex component EXO70B1-like [Elaeis guineensis]	501	501	81%	2e-165	47%	XP 010905198.1
	PREDICTED: exocyst complex component EXO70B1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	498	498	81%	4e-164	47%	XP 009405488.1
	Exocyst complex protein Exo70 [Macleaya cordata]	496	496	79%	1e-163	47%	OVA17508.1
	LOW QUALITY PROTEIN: exocyst complex component EX070B1 [Asparagus officinalis]	495	495	80%	8e-163	47%	XP 020261058.1
	PREDICTED: exocyst complex component EXO70B1 [Vitis vinifera]	493	493	81%	1e-162	47%	XP 002279988.1

Εικόνα 16. Απεικόνιση αποτελεσμάτων της πρωτεϊνικής ομολογίας του ΕΧΟ70 ID, με τη χρήση του BLASTP. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν υψηλή ομολογία με την ΕΧΟ70B1 πρωτεΐνη, μοκοκότυλων και δικότυλων φυτικών ειδών.

Επιλέξαμε να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη EXO70B1 του φυτού μοντέλου Arabidopsis thaliana. Επιπλέον, το Arabidopsis ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των Brassicaceae, στην οποία ανήκουν φυτά που μολύνονται από το υπό- μελέτη παθογόνο Xanthomonas campestris παθότυπο campestris. Επιπλέον, από εδώ και στο εξής και δεν το αναφέρουμε σε κάθε περίπτωση, οποιαδήποτε αλληλουχία γονιδίου ενισχύθηκε μέσω PCR, εισήχθη πρώτα σε έναν ενδιάμεσο φορέα συμβατό με την τεχνική κλωνοποίησης Golden Gate (pBluescript-GG) και εν συνεχεία στον εκάστοτε τελικό φορέα έκφρασης. Το επόμενο βήμα ήταν να κλωνοποιήσουμε το cDNA του γονιδίου exo70B1 από το Arabidopsis thaliana. Με ειδικούς εκκινητές, ενισχύσαμε μέσω PCR το γονίδιο, το οποίο δε φέρει ιντρόνια, και το κλωνοποιήσαμε στον τελικό φορέα έκφρασης για τη ζύμη, συντηγμένο στο καρβοξυτελικό άκρο της Gal4-DBD. Παρόμοια, σε Y2H ανάλυση παρατηρήσαμε ότι το ζεύγος AtEXO70B1/XccXOPP αλληλεπιδρούσε πολύ ισχυρά, όπως φαίνεται από τις διαδοχικές αραιώσεις (Εικ. 17Α, Γ). Παράλληλα, ελέγξαμε και την περίπτωση μη ειδικής αλληλεπίδρασης του ΧΟΡΡ. Για τον σκοπό αυτό κλωνοποιήσαμε τις δύο ισομορφές της AtExo70A1, καθώς η πρωτεΐνη αυτή εμφανίστηκε σε ελάχιστες περιπτώσεις ως αποτέλεσμα ομολογίας στο BLASTP. Ακολούθησαν οι Y2H αναλύσεις, όπου παρατηρήθηκε ότι ο XccXopP δεν αλληλεπιδρά με καμία ισομορφή της EXO70A1 (Εικ. 17A). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πρωτεϊνών στη ζύμη και επιβεβαιώθηκε η έκφραση της ισομορφής 1, ενώ για την ισομορφή 2 δεν καταφέραμε να δούμε έκφραση και χρειάζεται επανάληψη (Εικ. 17B).

Στην συνέχεια, θέλοντας να ελέγξουμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό του τελεστή, κλωνοποιήσαμε το γονίδιο *XccxopP* με μία καρβοξυτελική ετικέτα της χρωμοφόρου πρωτεΐνης mCherry και πραγματοποιήσαμε αγρο-εμποτισμό της κατασκευής σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*. Σε 72 ώρες μετά τον εμποτισμό με τροποποιημένα εργαστηριακά στελέχη *Agrobacterium tumefaciens* που φέρουν την κατασκευή 35S::*XccXopP*-mCherry για παροδική έκφραση, ελέγξαμε με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) τους ιστούς που είχαν εμποτιστεί. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17Ζ, ο *XccXopP*-mCherry εντοπίστηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και σε κυτταροπλασματικές γέφυρες. Επιπλέον, παρατηρήσαμε πως ο τελεστής εντοπίστηκε σε παρόμοια κυτταρικά υποδιαμερίσματα με την *At*EXO70B1 (Εικ. 17Z, (Sabol et al., 2017).

Στη συνέγεια, επιβεβαιώσαμε την αλληλεπίδραση AtEXO70B1/XccXOPP με τη χρήση άλλων τεχνικών ελέγχου προτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Συγκεκριμένα με έλεγχο Διμοριακής Συμπληρωματικότητας Φθορισμού (Biomolecular Fluorescence Complementation, BiFC) και συνανοσοκατακρήμνισης (Co-Immunoprecipitation, Co-IP). Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήσαμε σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης για φυτικά κύτταρα, το γονίδιο Atexo70B1 συντηγμένο καρβοξυτελικά είτε με το ήμισυ της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (nVENUS), είτε με μία ετικέτα διαδοχικών επαναλήψεων 6 πεπτιδίων FLAG και 3 αμινοξέων HIS (6x FLAG + 3x HIS, HF). Αντίστοιχα, κλωνοποιήσαμε το γονίδιο XccXopP συντηγμένο καρβοξυτελικά είτε με το άλλο μισό της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (cCFP), είτε με μία ετικέτα Myc. Ως αρνητικοί μάρτυρες ελέγχου του BiFC χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες AVRRPS4-cCFP και RRS1-S-nVENUS και για το πείραμα συν-κατακρήμνισης οι πρωτεΐνες AVRRPS4-HF και AVRRPS4-Myc. Ο AvrRps4 είναι ένας τελεστής παθογένειας από την Pseudomonas syringae, ενώ η πρωτεΐνη RRS1 62

αποτελεί έναν NLR υποδοχέα του Arabidopsis. Για τον έλεγχο αλληλεπίδρασης με την τεχνική BiFC, έγινε παροδική έκφραση των πλασμιδιακών κατασκευών, μέσω του Agrobacterium tumefaciens, σε φύλλα του είδους Nicotiana benthamiana. Τρεις ημέρες μετά τον εμποτισμό παρατηρήσαμε με συνεστιακή μικροσκοπία την ύπαρξη σήματος φθορισμού, γεγονός που επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση, ενώ καμία πρωτεΐνη δεν αλληλεπίδρασε με τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχου (Εικ. 17Δ). Παρομοίως, στο πείραμα co-IP με αντίσωμα a-Flag παρατηρήσαμε ότι ο XccXopP-myc συν-κατακρημνίστηκε με την EXO70B1-HF, αλλά όχι μαζί με την AVRRPS4-HF, ενώ ελέγχθηκε παράλληλα ότι και ο AVRRPS4-myc δεν συν-κατακρημνίστηκε με την EXO70B1-HF (Εικ. 17Ε).



Εικόνα 17. Απεικόνιση in vivo αλληλεπίδρασης του βακτηριακού τελεστή XccXopP με την AtEXO70B1 με τη χρήση BiFC και co-IP. A, Γ. Ο XccXopP αλληλεπίδρασε ειδικά και ισχυρά με την AtEXO70B1 (A, Γ) και όχι με την AtEXO70A1 (A) (έλεγχος αλληλεπίδρασης και με τις 2 ισομορφές), σε δοκιμασία των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα, όπως φάνηκε στο φτωχό θρεπτικό μέσο όπου απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). B. Ανάλυση κατά Western των δύο ισομορφών της AtEXO70A1, για τα οποία δεν παρατηρήσαμε αλληλεπίδραση με τον XccXopP και είναι συγχωνευμένα με την αμινοτελική

επικράτεια πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα Gal4 (Gal4-DBD). Ο πρωτεϊνικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8% β/ο. Οι ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τη ζύμη, που ήταν μετασχηματισμένη με τα αντίστοιχα πλασμίδια. Τα αναμενόμενα μεγέθη είναι 90,7 kDa (ισομορφή 1) και 77,6 kDa (ισομορφή 2). Απαιτείται επανάληψη της ανάλυσης έκφρασης για την ισομορφή 2. Δ. Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης με έλεγχο διμοριακής συμπληρωματικότητας φθορισμού. Συγκεκριμένα, μόνο σε υπερέκφραση του ζεύγους EXO70B1 – XccXopP (β1) είχαμε την ύπαρξη του σήματος της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (YFP), ενώ στους αρνητικούς μάρτυρες έλεγχου (β2, β3) δεν εντοπίστηκε YFP. Σε τρισδιάστατη (3D) προβολή, παρουσιάζεται ο εντοπισμός του ζεύγους αλληλεπίδρασης σε διάσπαρτα σημεία της πλασματικής μεμβράνης (β1'). Κλίμακα 10 μm. Ε. Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης με έλεγχο συν-κατακρήμνισης. Συγκεκριμένα, σε υπερέκφραση του ζεύγους, συνκατακρημνίστηκε ο XccXopP-myc μαζί με την EXO70B1-HF (αριστερά), ενώ δε συνέβη το ίδιο σε υπερέκφραση των δύο αυτών πρωτεϊνών με τους αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου (δεξιά, όπου υπάρχει κόκκινο αστέρι απουσιάζει η ζώνη συν-κατακρήμνισης). Ζ. Υποκυτταρικός εντοπισμός του XccXopP και της AtEXO70B1 που ήταν συγχωνευμένοι με την καρβοξυτελική γρωμοφόρο ετικέτα mCherry. Εκφράσαμε παροδικά την κάθε κατασκευή μόνη της σε φύλλα N. benthamiana και μετά από τρεις ημέρες παρατηρήσαμε την ύπαρξη σήματος σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Κλίμακα 10 μm.

Στον εντοπισμό των πρωτεϊνών, τόσο του τελεστή όσο και της ΕΧΟ70Β1 μέσω παροδικής έκφρασης σε φύλλα N. benthamiana, παρατηρήσαμε πως υπάργουν κάποια σημεία πιο έντονου φθορισμού (Εικ.17Ε). Παρομοίως, και στο BiFC σύμπλοκο, σε τρισδιάστατη απεικόνιση του κυττάρου, παρατηρήσαμε σημεία έντονου φθορισμού (Εικ. 17Δ). Για να ελέγξουμε ποια είναι τα υποκυτταρικά αυτά διαμερίσματα, στα οποία εντοπίστηκαν XccXopP, αλλά και το σύμπλοκο τελεστής EXO70B1-0 nVenus/XccXopP-cCFP, πραγματοποιήσαμε παροδική συν-έκφραση του *Xcc*XopP ή του συμπλόκου EXO70B1/*Xcc*XopP με ορισμένες πρωτεΐνεςμάρτυρες υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Στον πίνακα 5, αναφέρονται οι πρωτεΐνες-μάρτυρες και οι κατασκευές με τις οποίες συν-εκφράστηκαν με τον τελεστή ή το σύμπλοκο. Συγκεκριμένα, συν-εκφράσαμε τον XccXopP και το σύμπλοκο με πρωτεΐνες, που εντοπίζονται στην πλασματική διαμέρισμα ενδοκυτταρικής οδού μεμβράνη, στο της των πρώιμων/ώριμων ενδοσωμάτων και στα αυτοφαγοσώματα.

Παρατηρήσαμε συν-εντοπισμό μόνο με την πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης, τόσο με τον τελεστή, όσο και με το σύμπλοκο. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε συν-εντοπισμός με τον πρωτεϊνικό μάρτυρα της ενδοκυτταρικής οδού, ούτε με τον μάρτυρα των αυτοφαγοσωμάτων (Εικ. 18A, B).

Πίνακας 5. Απεικόνιση	των πρωτεϊνών –	μα	ρτύρων	υποι	κυτταρι	κών	[,] διαμερι σ μάτ	των.	Οı
πρωτεΐνες – μάρτυρες	συν-εκφράστηκαν	σε	φύλλα	του	είδους	Ν.	benthamiana	με	τις
κατασκευές που αναφέρ	ονται στην τρίτη στ	ήλη							

Πρωτεΐνες - μάρτυρες	Δείκτης υπό- κυτταρικού	Πλασμιδιακή κατασκευή συν-
	διαμερίσματος	έκφρασης
1. 35S::PM-RFP	Πλασματική μεμβράνη	XccXopP-YFP
		AtExo70B1-
		nVenus +
		XccXopP-cCFP
2. 35S:: <i>Ds</i> Red-FYVE	Πρώιμα/Τελικά	XccXopP-YFP
	ενδοσώματα	AtExo70B1-
		nVenus +
		XccXopP-cCFP
3. Ubi10::mCherry::Atg8A::Alli mCherry	Αυτοφαγοσώματα	XccXopP-YFP
		AtExo70B1-
		nVenus +
		XccXopP-cCFP



Εικόνα 18. Α, Β. Συν-εντοπισμός του τελεστή XccXopP & του BiFC συμπλόκου AtEXO70B1/XccXopP με πρωτεϊνικούς μάρτυρες-δείκτες υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Πραγματοποιήθηκε συν-εντοπισμός των PM-RFP (πλασματική μεμβράνη), DsRed-FYVE (μεμβρανική ενδοκυτταρική οδός πρώιμων/ώριμων ενδοσωμάτων) και mCherry-Atg8a (αυτοφαγοσώματα) πρωτεϊνικών – δεικτών με τον XccXopP-YFP (A) και το BiFC σύμπλοκο AtEXO70B1/XccXopP (B) σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Κλίμακα 10 μm. Με δείκτες (βέλη χωρίς γραμμές) φαίνονται οι θέσεις συν-εντοπισμού του XccXopP και του AtEXO70B1/XccXopP με την πρωτεϊνη-μάρτυρα της πλασματικής μεμβράνης. Με λευκά βέλη (κανονικές γραμμές) φαίνονται τα αυτοφαγοσώματα, ενώ με κόκκινα βέλη (διακεκομμένες γραμμές) φαίνονται τα συσσωματώματα που δημιουργεί ο βακτηριακός τελεστής τόσο μόνος του όσο και σε σύμπλοκο με την AtEXO70B1.

Επιπρόσθετα, θέλοντας να αναγνωρίσουμε ποιες είναι οι πρωτεϊνικές επικράτειες που είναι «υπεύθυνες» για την αλληλεπίδραση, τόσο στην πρωτεΐνη AtEXO70B1, όσο και στον βακτηριακό τελεστή, αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε μικρότερες περιοχές των δύο αυτών γονιδίων και να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση τους, με τη χρήση Υ2Η. Η δομή της AtEXO70B1, λόγω υψηλής ομολογίας με την συγγενική AtEXO70B2, μας επέτρεψε να σχεδιάσουμε in-silico τρεις αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές του γονιδίου (AB, BC, CD) (Teh O.K. et al., 2019) (Εικ. 19Α). Ωστόσο, η βακτηριακού είναι οπότε δομή του τελεστή δεν γνωστή, πραγματοποιήσαμε μία πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής του με τη χρήση του προγράμματος Phyre2 (Kelley et al., 2016). Σύμφωνα με αυτό, αποφασίσαμε να γωρίσουμε τον XccXopP σε δύο μεγάλα μέρη (αμινο- και καρβοξυ- τελικό μέρος, Εικ. 19Β). Όπως παρατηρήθηκε στην Υ2Η ανάλυση, οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπίδρασαν μέσω των αμινοτελικών τους άκρων και συγκεκριμένα, τα πρώτα 388 αμινοξέα της ΕΧΟ70Β1 ήταν υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με το αμινοτελικό μισό του τελεστή (Εικ. 19 A, B). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western για να επιβεβαιώσουμε την έκφραση και των δύο άλλων αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων της ΕΧΟ70B1 (Εικ. 19Γ).

Είχε παρατηρηθεί σε πρωτεϊνικό πήκτωμα πολύ-ακρυλαμίδης (από άλλο μέλος του εργαστηρίου) ότι αποκόπτονται τα πρώτα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας του τελεστή (Δεδομένα της Διδακτορικής Διατριβής του Κων/νου Κωτσαρίδη), αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε τον βακτηριακό τελεστή χωρίς τα πρώτα 100 αμινοξέα της αλληλουχίας του και να ελέγξουμε εκ νέου εάν διατηρείται η ικανότητα της αλληλεπίδρασης, την οποία επιβεβαιώσαμε σε Υ2Η ανάλυση (εικ. 19Β).



Εικόνα 19. Απεικόνιση αλληλεπίδρασης των αμινοτελικών τμημάτων ΕΧΟ70 - XccXopP. Α. Σχηματική απεικόνιση των τριών αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων της AtEXO70B1 και έλεγχος αλληλεπίδρασης τους με την ολόκληρη αλληλουχία του τελεστή XccXopP, με τη γρήση της δοκιμασίας των δύο υβριδίων στο σακγαρομύκητα. Μόνο το ΑΒ τμήμα αλληλεπίδρασε με τον XccXopP, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). **B**. Σχηματική απεικόνιση των αμινο- και καρβοξυ- τελικών τμημάτων (N- και C-) του XccxopP, καθώς επίσης και του τμήματος στο οποίο απουσιάζουν τα πρώτα 100 αμινοξέα (-100) και έλεγχος αλληλεπίδρασης τους με το AB τμήμα της AtEXO70B1, με τη χρήση της δοκιμασίας των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Ο βακτηριακός τελεστής αλληλεπίδρασε με την ΕΧΟ70Β1-ΑΒ από το αμινοτελικό του άκρο (τα πρώτα 420 αμινοξέα της αλληλουχίας του), ενώ αφαιρώντας τα πρώτα 100 αμινοξέα της αλληλουχίας του, διατήρησε την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ΕΧΟ70Β1-ΑΒ, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσίαζαν τα στοιγεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). Γ. Ανάλυση κατά Western των δύο αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων της AtExo70B1, για τα οποία δεν παρατηρήσαμε αλληλεπίδραση με τον XccXopP (BC και CD) και είναι συγχωνευμένα με την αμινοτελική επικράτεια πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα Gal4 (Gal4-DBD). Ο πρωτεϊνικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8% β/ο. Οι ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τη ζύμη, που ήταν μετασχηματισμένη με τα αντίστοιχα πλασμίδια. Τα αναμενόμενα μεγέθη είναι 40 kDa (BC τμήμα) και 45 kDa (CD τμήμα).

Στη συνέχεια, μελετήσαμε το κατά πόσον η αλληλεπίδραση της ΕΧΟ70Β1 είναι ειδική μόνο για τον XccXopP από το είδος Xanthomonas campestris παθότυπο campestris, ή εάν αλληλεπιδρά και με άλλους ομόλογους τελεστές από άλλα είδη και άλλα γένη. Για το σκοπό αυτό, αναζητήσαμε τα ομόλογα του XccXopP σε δύο βάσεις δεδομένων (NCBI και KEGG). Δεν περιοριστήκαμε στο γένος Xanthomonas αλλά διευρύναμε την αναζήτησή μας και σε άλλα γένη π.χ. Ralstonia και Acidovorax. Πραγματοποιήσαμε φυλογενετική ανάλυση των ομόλογων τελεστών, με τη χρήση της μεθόδου Μέγιστης Πιθανότητας (Maximum Likelihood, ML, με το software MEGA5 (Tamura et al., 2011) και κατασκευάσαμε το φυλογενετικό απεικονίζεται δέντρο, που στην εικόνα 20A. Παρατηρήθηκαν πέντε υπο-ομάδες, που περιλαμβάνει την ομάδα με γένη Ralstonia, την ομάδα με γένη Acidovorax και τρεις ομάδες με τα διαφορετικά είδη Xanthomonas, που περιλαμβάνουν τους ομόλογους XopP1, XopP2 και τον XccXopP. Στη συνέχεια, ελέγξαμε με Y2H ανάλυση εάν η AtEXO70B1 αλληλεπιδρά με έναν χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο της κάθε ομάδας. Παράλληλα, εξετάσαμε τις πιθανές αλληλεπίδρασεις και με την AtEXO70F1, που φυλογενετικά βρίσκεται μακριά της AtEXO70B1 (Stegmann et al., 2012). Από την αναλυση μας φάνηκε ότι η EXO70F1 αλληλεπιδρά με τον ομόλογο τελεστή XocXopP1. σε αντίθεση με την ΕΧΟ70Β1 που δεν αλληλεπιδρά με κανένα από τα ομόλογα του XccXopP (Εικ. 20В).



Εικόνα 20. Απεικόνιση της φυλογενετικής σχέσης των ομολόγων του XccXopP από διαφορετικά γένη και είδη βακτηρίων και έλεγχος αλληλεπίδρασης χαρακτηριστικών αντιπροσώπων κάθε ομάδας του δέντρου με την EXO70B1 και EXO70F1. Α. Απεικόνιση της φυλογενετικής σχέσης των ομολόγων του XccXopP. Παρουσιάστηκαν 5 υπο-ομάδες, εκ των οποίων μία ομάδα με γένη Ralstonia, μία ομάδα με γένη Acidovorax και τρεις ομάδες με γένη Xanthomonas, που περιλαμβάνουν τους ομόλογους XopP1, XopP2 και τον XccXopP που αλληλεπίδρασε με το EXO70 ID, αντίστοιχα. Τα είδη με έντονη γραφή αποτελούν χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους της κάθε ομάδας και είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην εικόνα σε Y2H ανάλυση (Εικ. 19B). Β. Έλεγχος αλληλεπίδρασης με τη δοκιμασία των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα μεταξύ των τεσσάρων χαρακτηριστικών αντιπροσώπων από κάθε υπό-ομάδα και της AtEXO70B1 ή AtEXO70F1. Μόνο η AtEXO70F1 αλληλεπίδρασε με τον ομόλογο XocXopP1, ενώ η EXO70B1 με κανέναν ομόλογο τελεστή, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσιάζουν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A).

Στη συνέχεια θέλαμε να μελετήσουμε εάν ο XccXopP αλληλεπιδρά και με παράλογες ή/και ομόλογες πρωτεΐνες της EXO70B1. Για το λόγο αυτό, αποφασίσαμε να κλωνοποιήσουμε τα γονίδια exo70B2 και exo70F1 από το Arabidopsis thaliana, των οποίων τα προϊόντα είναι φυλογενετικά κοντά ή μακριά με την EXO70B1, αντίστοιχα (Stegmann et al., 2012). Επιπλέον, κλωνοποιήσαμε την ομόλογη πρωτεΐνη από το μονοκότυλο είδος Oryza brachyantha (άγριο ρύζι), του οποίου η αλληλουχία έχει προβλεφθεί in-silico στη βάση δεδομένων NCBI. Για την κλωνοποίηση του γονιδίου ObExo70B1 χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το ολικό cDNA του Oryza brachyantha. Κατά την διαδικασία της επαλήθευσης της αλληλουχίας, παρατηρήσαμε ότι μία κοντύτερη μορφή της ObEXO70B1 κυριαρχούσε και η οποία υπολείπεται κατά 234 αμινοξέα. Είναι ενδιαφέρον, ότι την προβλεπόμενη από το NCBI αλληλουχία καταφέραμε να την ενισχύσουμε μέσω PCR μόνο χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο γενωμικό DNA άγριου ρυζιού (Εικ. 21A), γεγονός που μας δείχνει ότι στο είδος αυτό δεν εκφράζεται η προβλεπόμενη ObEXO70B1 (τουλάχιστον στις εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης).

Για λόγους συντομίας, θα αναφέρουμε τις ομόλογες πρωτεΐνες από το άγριο ρύζι από εδώ και στο εξής ως ObEXO70B1_small και ObEXO70B1 large, αντίστοιγα. Με τη χρήση Y2H, παρατηρήσαμε ότι ο XccXopP αλληλεπιδρά με όλες τις παράλογες, αλλά όχι με τις ομόλογες από το μονοκότυλο είδος (Εικ. 21B). Η έκφραση των DBD-ObEXO70B1_small και DBD-ObEXO70B1_large πρωτεϊνών ελέγχθηκε σε ανάλυση κατά Western (Εικ. 21Γ). Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε συστοίγιση όλων των πρωτεϊνικών αλληλουγιών που αλληλεπιδρούν, συμπεριλαμβανομένου και του ID, αλλά και αυτών που δεν αλληλεπιδρούν, με τον τελεστή (εικ. 22Α). Σκοπός μας ήταν να βρούμε κάποια/ες μεταλλαγή/ες σε αμινοξέα που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την απώλεια της αλληλεπίδρασης. Για αυτό, εστιάσαμε στην περιοχή αλληλεπίδρασης, δηλαδή στα πρώτα 388 αμινοξέα (με βάση την πρωτεϊνική αλληλουχία ΕΧΟ70Β1) (Εικ. 19Α). Αναζητώντας αμινοξικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον XccXOPP αλλά και αυτών που δεν αλληλεπιδρούν, αναγνωρίσαμε μία αμινοξική αλλαγή στην ObEXO70B1 small (κόκκινο αστέρι), στη θέση 134 όπου το αμινοξύ λυσίνη (Κ) έχει αντικαταστήσει το γλουταμικό οξύ (Ε), το οποίο φαίνεται να είναι παρόν σε όλες τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον τελεστή (Εικ. 22Α). Αντίστοιγα, και η ObEXO70B1_large, στην ίδια θέση (368), εμφάνισε Κ αντί Ε (Εικ. 22A). Το επόμενο βήμα ήταν να μεταλλάξουμε την πρωτεϊνική αλληλουχία της ObEXO70B1_small και _large σε K134E και K368E, αντίστοιχα, αλλά και την AtEXO70B1 σε E347K. Σκοπός μας ήταν να ελέγξουμε την επανάκτηση της αλληλεπίδρασης των ObEXO70B1_small και large πρωτεϊνών με τον XccXopP, αλλά και εάν η αρχική πρωτεΐνη του

70

Arabidopsis thaliana χάνει την ικανότητα της να αλληλεπιδρά με τον τελεστή, αντίστοιχα.

Στη μελέτη Y2H παρατηρήθηκε ότι η *Ob*EXO70B1_small^{K134E} ανακτά την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον *Xcc*XopP σε αντίθεση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά, η *Ob*EXO70B1_large^{K368E} δεν αλληλεπίδρασε με τον τελεστή σε καμία από τις τρεις βιολογικές επαναλήψεις που πραγματοποιήσαμε. Η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στη ζύμη επιβεβαιώθηκε σε στύπωμα κατά Western (Εικ. 21Γ). Επίσης, η μεταλλαγμένη *At*EXO70B1^{E347K} δεν έχασε την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με τον *Xcc*XopP (Εικ. 22B).



Εικόνα 21. Απεικόνιση των ομόλογων γονιδίων EXO70B1 στο άγριο ρύζι και αλληλεπίδρασή τους με τον βακτηριακό τελεστή XccXopP. Α. Σχηματική απεικόνιση των δυο ισομορφών (small και large εκδοχές) EXO70B1 από το άγριο ρύζι (Oryza brachyantha) σε σχέση με το ομόλογο γονίδιο της A. thaliana. B. Έλεγχος αλληλεπίδρασης μεταξύ των παράλογων πρωτεϊνών EXO70B1, EXO70F1, EXO70B2 της A. thaliana και ομόλογων πρωτεϊνών EXO70B1 του άγριου ρυζιού με τον βακτηριακό τελεστή XccXopP, μέσω Y2H ανάλυσης. Η ομόλογη πρωτεΐνη από το άγριο ρύζι (και οι δύο εκδοχές) δεν αλληλεπίδρασε με τον XccXopP, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). Γ. Έλεγχος της έκφρασης των δύο εκδοχών ObEXO70B1 στο σακχαρομύκητα σε ανάλυση κατά Western, καθώς επίσης και της μεταλλαγμένης ObEXO70B1^{K368E}. Οι ζώνες που εμφανίστηκαν αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος των δύο εκδοχών της πρωτεΐνης (66kDa και 90,6 kDa για τη μικρή και μεγάλη εκδοχή, αντίστοιχα).



Εικόνα 22. Α. Συστοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών που αλληλεπίδρασαν και μη με τον βακτηριακό τελεστή *Xcc*XOPP, συμπεριλαμβανομένου και του ΕΧΟ70 ID, με 72
τη χρήση του προγράμματος DNAMAN. Η συστοίχιση είναι εστιασμένη στην περιοχή αλληλεπίδρασης της ΕΧΟ70Β1 με τον τελεστή, δηλαδή στα πρώτα 388 αμινοξέα της αλληλουχίας της. Από τη στοίχιση αναγνωρίστηκε ένα μόνο αμινοξύ (σημειωμένο με κόκκινο αστέρι) που ήταν διαφοροποιημένο στην ObEXO70B1 σε σγέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες και συγκεκριμένα μία λυσίνη (Κ) αντί ενός γλουταμικού οξέος (Ε). Στη συστοίχιση παρουσιάστηκε μόνο η μικρή εκδοχή της πρωτεΐνης από το άγριο ρύζι, αλλά τα αποτελέσματα συστοίχισης, καθώς και το αμινοξύ στη θέση αυτή δεν άλλαξαν και στην περίπτωση της μεγάλης εκδοχής της πρωτεΐνης. Β. Έλεγχος αλληλεπίδρασης σε δοκιμασία των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα μεταξύ των πρωτεϊνών αγρίου τύπου της AtEXO70B1, ObEXO70B1 (small και large εκδοχές), καθώς επίσης και των μεταλλαγμένων μορφών AtEXO70B1^{E347K}, ObEXO70B1 (small^{K134E} και large^{K368E} εκδοχές) με τον βακτηριακό τελεστή XccXopP. Στην περίπτωση της ObEXO70B1 small^{K134E} υπήρχε αλληλεπίδραση, που δεν υπήρχε στην αγρίου τύπου, ενώ δεν παρατηρήθηκε το ίδιο για τη μεγάλη εκδοχή της πρωτεΐνης. Επίσης, στην περίπτωση της AtEXO70B1^{E347K}, η αλληλεπίδραση με τον XccXopP δε χάθηκε, όπως φάνηκε στο φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (Α).

III. Διερεύνηση του μηχανισμού παθογένειας του XccXopP.

i. Διατάραξη της φυσιολογίας του κυττάρου.

Ο XccXopP αποτελεί έναν συντηρημένο τελεστή, που εκκρίνεται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ των ξανθομονάδων στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή τους. Η δομή και η λειτουργία του βακτηριακού τελεστή δεν είναι γνωστές. Παρόλα αυτά έχει βρεθεί από την ερευνητική ομάδα του Jiang (Jiang et al., 2009) και επιβεβαιώσαμε κι εμείς (Εικ. 23Δ), ότι η ξανθομονάδα Xcc στέλεχος 8004 που φέρει μετάλλαξη ως προς το συγκεκριμένο γονίδιο του XccXopP (060E08), παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη παθογόνο ικανότητα.

Η πρωτεΐνη EXO70B1, που βρήκαμε ότι αποτελεί έναν από τους στόχους του XccXopP, είναι μέλος του οκταμερούς συμπλόκου εξωκύττωσης, που στόχο έχει να δεσμεύσει τα εκκριτικά κυστίδια που εξέρχονται από το σύστημα Golgi και να τα προωθήσει προς την πλασματική μεμβράνη, με τη βοήθεια και άλλων πρωτεϊνών του φυτικού κυττάρου (Guo et al., 1999). Επομένως, έχοντας υπόψη ότι ο XccXopP στοχεύει μέλη του συμπλόκου αυτού, θέλαμε να διερευνήσουμε το μηχανισμό παθογένειας του και συγκεκριμένα με ποιο τρόπο «χειραγωγεί» τη διαδικασία της εξωκύττωσης, εάν τη μπλοκάρει ή τη χρησιμοποιεί προς όφελός του.

Αρχικά, ελέγξαμε εάν ο υπό-μελέτη τελεστής επηρεάζει την έκκριση της πρωτεΐνης Pathogenesis-Related 1A (PR1a), η οποία εκκρίνεται στον αποπλάστη με τη βοήθεια του συμπλόκου εξωκύττωσης, ως απόκριση της βασικής άμυνας ΡΤΙ του φυτικού κυττάρου έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Du et al., 2015; Gu and Innes, 2012; Hammond-Kosack et al., 1994). Χρησιμοποιήσαμε ως εργαλείο τον τελεστή παθογένειας του βακτηρίου Clavibacter michiganensis υποείδους sepedonicus, Chp7. O τελεστής αυτός εκκρίνεται από το βακτήριο στον εξωκυττάριο χώρο όπου και αναγνωρίζεται από μεμβρανικούς υποδοχείς του κυττάρου, ενεργοποιώντας την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR). Όταν όμως εκφραστεί ενδοκυτταρικά, στα κύτταρα του ξενιστή δεν ενεργοποιεί καμία αντίδραση (Lu et al., 2015).

Σκεφτήκαμε να εκφράσουμε ενδοκυτταρικά, σε κύτταρα του ξενιστή, μία χιμαιρική μορφή του Chp7, όπου θα έχουμε κάνει σύντηξη του εκκριτικού πεπτιδίου της PR1a (PR1a secretion peptide, PR1sp) με τον τελεστή (PR1sp-Chp7). Αυτό θα οδηγούσε τον Chp7, μέσω του συμπλέγματος εξωκύττωσης, στο αποπλάστη όπου και θα ενεργοποιούσε την HR. Αντίθετα, η παρεμπόδιση του συμπλέγματος εξωκύττωσης από τον *Xcc*XopP, θα επιδρούσε αρνητικά στην επαγωγή της HR.

Έτσι, υπερεκφράσαμε σε φύλλα Nicotiana tabacum ποικιλιών Petit Gerard και N34/4 τις πλασμιδιακές κατασκευές 35S::PR1sp-Chp7 καθώς και τις 35S::PR1sp-Chp7 / 35S::XccXopP-mCherry και ελέγξαμε την πιθανή παρεμπόδιση της επαγωγής της HR από τον XccXopP. Ως αρνητικό μάρτυρα ελέγχου, χρησιμοποιήσαμε την πλασμιδιακή κατασκευή 35S::GUS αντί του τελεστή της Xanthomonas. Σε 72 ώρες μετά τον αγροεμποτισμό, παρατηρήσαμε την εμφάνιση HR μόνο στην περιοχή συνέκφρασης του αρνητικού μάρτυρα ελέγχου με τον PR1sp-Chp7, όχι όμως στην περιοχή συνέκφρασης με τον XccXopP. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν συνολικά σε τρεις βιολογικές επαναλήψεις και σε σύνολο 15 φυτών (Εικ. 23A). Παράλληλα, αποκλείσαμε το γεγονός ο XccXopP να δρα ως γενικός καταστολέας του ενδοκυτταρικού HR, καθώς σε συνέκφραση με τον τελεστή ΧopQ από το βακτήριο Xanthomonas campestris παθότυπο vesicatoria, που προκαλεί ενδοκυτταρικό HR σε φυτά Nicotiana tabacum, ο XccXopP δεν ανέστειλε την εμφάνιση της HR (Εικ. 23B). Παρόμοια, αποκλείσαμε το γεγονός ο *Xcc*XopP να αλληλεπιδρά με τον τελεστή Chp7, ελέγχοντας την ύπαρξη αλληλεπίδρασης τους σε δοκιμασία δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Εικ. 23Γ).

Επιπλέον, θέλαμε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας και με τη γρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάσαμε τη γιμαιρική πρωτεΐνη RFP-GFP, υπό την έκφραση του 35S υποκινητή του μωσαϊκού του καπνού (CaMV 35S) και σε σύντηξη ή χωρίς, με το εκκριτικό πεπτίδιο της PR1a πρωτεΐνης (35S::RFP-GFP και 35S::PR1sp-RFP-GFP, αντίστοιγα). Η γιμαιρική πρωτεΐνη, που δε φέρει εκκριτικό πεπτίδιο, εντοπίστηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων, όπως φαίνεται από τον εντοπισμό του διπλού σήματος της πράσινης (GFP) και της κόκκινης (RFP) φθορίζουσας πρωτεΐνης (Εικ. 23Ε, πάνω σειρά). Αντίθετα, όταν η χιμαιρική πρωτεΐνη οδηγήθηκε στον αποπλάστη μέσω του PR1sp (και σε συν-έκφραση με τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχου GUS), τότε παρατηρήσαμε μόνο το σήμα της RFP στον αποπλάστη. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το σήμα της GFP γάνεται στο όξινο περιβάλλον του αποπλάστη (Εικ. 23Ε, μεσαία σειρά). Μεταξύ των παραγόντων που συμβάλλουν στη σταθερότητα μίας φθορίζουσας πρωτεΐνης στο όξινο περιβάλλον του αποπλάστη είναι η σταθερά διάστασης οξέος (pKa), η οποία στην περίπτωση της GFP που γρησιμοποιήσαμε, είναι αρκετά μεγάλη και δεν την καθιστά ιδεατή για παρατήρηση του σήματος σε χαμηλό pH (Stoddard and Rolland, 2019). Όταν όμως συνεκφράσαμε την κατασκευή 35S::PR1sp-RFP-GFP με την κατασκευή του τελεστή 35S::XccXopP-eCFP, τότε παρατηρήθηκαν και τα δύο σήματα φθορισμού (GFP και RFP) να εντοπίζονται όμως πλέον κατά κύριο λόγο σε συσσωματώματα-δομές που παρομοιάζουν τα εκκριτικά κυστίδια, ως αποτέλεσμα της παρεμπόδισης της εξωκύττωσής τους (Εικ. 23Ε, κάτω σειρά).



Εικόνα 23. Α. Υπερ-έκφραση του βακτηριακού τελεστή Chp7 του είδους Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus, συγχωνευμένου με το εκκριτικό πεπτίδιο της PR1a πρωτεΐνης, σε φύλλα Nicotiana tabacum cv. Petit Gerard/N34-4, σε συν-έκφραση με τον βακτηριακό τελεστή XccXopP ή με τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχου GUS. Όλες οι κατασκευές ήταν υπό την έκφραση του 35S υποκινητή του μωσαϊκού του καπνού. Μετά από 72 ώρες, εμφανίστηκε HR μόνο στην περίπτωση της συν-έκφρασης με το GUS και όχι με τον XccXopP. **B**. Υπερ-έκφραση του βακτηριακού τελεστή XopO του είδους Xanthomonas campestris παθότυπου campestris, σε φύλλα Nicotiana tabacum ποικιλίας Petit Gerard, σε συν-έκφραση με τον βακτηριακό τελεστή XccXopP ή με τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχου GUS. Όλες οι κατασκευές ήταν υπό την έκφραση του 35S υποκινητή του μωσαϊκού του καπνού. Μετά από 72 ώρες, εμφανίστηκε HR και στις δύο περιπτώσεις. Γ. Έλεγχος αλληλεπίδρασης σε δοκιμασία των δύο υβριδίων στον σακγαρομύκητα μεταξύ των CmChp7 και του βακτηριακού τελεστή XccXopP. Το υπό-εξέταση ζεύγος δεν αλληλεπίδρασε, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). Δ. Έλεγχος της παθογένειας της ζανθομονάδας αγρίου τύπου (Xcc 8004, WT) και της ξανθομονάδας που φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο του XccXopP (Xcc 8004, 060E08) σε φυτά αγριοράπανου (Chinese radish). Όπως φάνηκε, η παθογένεια της μεταλλαγμένης ξανθομονάδας μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με την αγρίου τύπου. Ε. Υπερ-έκφραση της γιμαιρικής πρωτεΐνης RFP-GFP, είτε γωρίς εκκριτικό πεπτίδιο ή συγγωνευμένης με το εκκριτικό πεπτίδιο της PR1a πρωτεΐνης, σε φύλλα Nicotiana benthamiana. Ταυτόχρονη συν-έκφραση του βακτηριακού τελεστή XccXOPP-eCFP ή του αρνητικού μάρτυρα ελέγχου GUS-myc μαζί με την κατασκευή PR1sp-RFP-GFP. Όλες οι κατασκευές ήταν υπό την έκφραση του 35S υποκινητή του μωσαϊκού του καπνού. Μετά από 72 ώρες, παρατηρήθηκε σήμα σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Όταν εκφράστηκε η χιμαιρική πρωτεΐνη χωρίς το εκκριτικό πεπτίδιο παρατηρήθηκε κυτταροπλασματικό και πυρηνικό σήμα φθορισμού και από τις δυο πρωτεΐνες (GFP και RFP). Αντίθετα, όταν συν-εκφράστηκε η PR1sp-RFP-GFP μαζί με GUS (αρνητικός μάρτυρας ελέγχου) το σήμα της GFP είχε σχεδόν ολοκληρωτικά χαθεί στο όξινο περιβάλλον του αποπλάστη και εξέπεμψε μόνο το σήμα από την RFP πρωτεΐνη. Παρουσία του XccXopP, παρουσιάστηκε σήμα και από τις δύο πρωτεΐνες, που εντοπίστηκε πλέον σε συσσωματώματαδομές που ομοιάζαν με εκκριτικά κυστίδια (άσπρα βέλη). Κλίμακα 10 μm.

Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε η συμμετοχή των πρωτεϊνών του Arabidopsis thaliana EXO70B1 και EXO70B2 στη μεταφορά στην πλασματική μεμβράνη του μεμβρανικού υποδοχέα άμυνας FLS2. (Wang et al., 2020). Καθώς δείξαμε προηγουμένως, ότι ο XccXopP στοχεύει τις δύο αυτές πρωτεΐνες (Εικ. 21Β), δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν ο τελεστής διαταράσσει τα επίπεδα του υποδοχέα άμυνας FLS2 στη μεμβράνη. Για το σκοπό αυτό, συν-εκφράσαμε παροδικά σε φύλλα N. benthamiana την πρωτεΐνη FLS2-GFP (υπό την έφραση του ενδογενούς υποκινητή FLS2) και τον τελεστή XccXopP-mCherry και ελέγξαμε σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού τα επίπεδα έκφρασης του FLS2 στην πλασματική μεμβράνη. Ως αρνητικό μάρτυρα ελέγχου, χρησιμοποιήσαμε άδειο αγροβακτήριο (χωρίς έκφραση κάποιου πλασμιδίου). Στη συνέχεια, ποσοτικοποιήσαμε τα επίπεδα φθορισμού GFP με τη χρήση του λογισμικού ImageJ, σε κύτταρα στα οποία είχαμε καλή έκφραση του XccXopP-mcherry. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν δύο υπό-πληθυσμούς φυτικών κυττάρων, μία ομάδα (τη μεγαλύτερη) στην οποία τα επίπεδα του FLS2 στην πλασματική μεμβράνη είναι μειωμένα σχεδόν στο μισό, σε σγέση με την έκφραση του FLS2 απουσία του XccXopP (Εικ. 24 A^I, B). Επίσης, μία δεύτερη ομάδα στην οποία τα επίπεδα του υποδοχέα FLS2 στη μεμβράνη έγουν μειωθεί στο ελάγιστο, με ταυτόγρονο εντοπισμό του σε δομές που ομοιάζουν με εγκλωβισμένα εκκριτικά κυστίδια (Εικ. 24 Α^{II}, B).



Εικόνα 24. Α. Απεικόνιση σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού των επιπέδων της πρωτεΐνης FLS2 στην πλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου, απουσία και παρουσία του βακτηριακού τελεστή *Xcc*XopP. Στο κανάλι GFP παρουσιάζονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης FLS2-GFP, ενώ στο κανάλι mCherry τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης *Xcc*XopP-mCherry. Διακρίθηκαν δύο υπό-πληθυσμοί φυτικών κυττάρων. Στην πρώτη ομάδα (I) η έκφραση της FLS2-GFP ήταν μειωμένη κατά 50% (I). Στη δεύτερη ομάδα (II) η έκφραση της FLS2-GFP ήταν ελαχιστοποιημένη και η πρωτεΐνη εντοπίστηκε σε δομές που ομοιάζαν με εκκριτικά κυστίδια. Κλίμακα 10 μm. **B**. Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων φθορισμού της FLS2-GFP πρωτεΐνης απουσία και παρουσία του τελεστή *Xcc*XopP, με τη χρήση του προγράμματος ImageJ. Τα συνολικά κύτταρα που μετρήθηκαν απουσία και παρουσία του τελεστή ήταν 37 και 40, αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, είχε περιγραφεί στη βιβλιογραφία, ότι η EXO70B1 του Arabidopsis, φυλάσεται από έναν NLR υποδοχέας άμυνας, τον TN2 (Zhao et al., 2015). Ο παράγοντας παθογένειας AvrPtoB, της *Pseudomonas syringae*, ουβικιτινυλιώνει την πρωτεΐνη EXO70B1 ενεργοποιώντας έτσι την αποδόμηση της. Ως αποτέλεσμα ο TN2 ελευθερώνεται και ενεργοποιεί με αυτό τον τρόπο την άμυνα μέσω της επαγωγής της HR στο Arabidopsis thaliana, αλλά και σε υπερ-έκφραση στο φυτό Nicotiana tabacum ποικιλίας Xanthi (Wang et al., 2019c).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η δράση του βακτηριακού τελεστή είναι άγνωστη. Επομένως, θέλαμε να διερευνήσουμε εάν έχει παρόμοια δράση με τον τελεστή AvrPtoB της Ψευδομονάδας, εάν δηλαδή ενεργοποιεί την άμυνα μέσω του κυτταροπλασματικού υποδογέα άμυνας TN2. Για το σκοπό αυτό, κλωνοποιήσαμε τον υποδογέα άμυνας tn2 από το φυτό μοντέλο Arabidopsis thaliana και το συγγενικό καλλιεργούμενο είδος Brassica napus και συν-εκφράσαμε σε φυτά καπνού ποικιλίας Petit Gerard την πλασμιδιακή κατασκευή 35S::AtTN2-YFP ή την 35S::BnTN2-YFP με ή χωρίς την κατασκευή 35S::AtEXO70B1-mCherry. Η έκφραση μόνο του υποδοχέα BnTN2 επέφερε την επαγωγή της HR ήδη από τη δεύτερη μέρα έκφρασης (Εικ. 25Α) η οποία κατεστάλθηκε με την συνέκφραση της πρωτεΐνης EXO70B1-mCherry, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν από τους (Wang et al., 2019c) (Εικ. 25Α). Όμως δεν παρατηρήσαμε το ίδιο και για τον υποδογέα του Arabidopsis, παρόλο που πιστοποιήθηκε η έκφραση και των δύο TN2-YFP πρωτεϊνών σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Εικ. 25Γ). Για τον υποδοχέα άμυνας AtTN2 πραγματοποιήσαμε παροδική έκφραση του και σε φυτά άλλων ποικιλιών του είδους N. tabacum, με τα ίδια όμως αποτελέσματα (ποικιλίες N34/4 και Xanthi).

Στη συνέχεια, σε συν-έκφραση των κατασκευών 35S::AtEXO70B1mCherry/35S::BnTN2-YFP παρουσία του *Xcc*XopP-eCFP, δεν παρατηρήσαμε επαγωγή της HR (Εικ. 25A). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο XccXopP στοχεύοντας και αλληλεπιδρώντας με την EXO70B1, δεν εμφανίζει δράση όμοια με αυτή του AvrPtoB (Wang et al., 2019c), αποφεύγοντας την ενεργοποίηση της άμυνας μέσω του υποδογέα TN2. Επιπλέον, αποκλείσαμε το γεγονός ο XccXopP να απενεργοποιεί τους ΤΝ2 υποδοχείς μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης, χρησιμοποιώντας την δοκιμασία των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Εικ. 25B). Για τον ίδιο λόγω, συν-εκφράσαμε τον *Xcc*XopP με τον 35S::*Bn*TN2-YFP και δεν παρατηρήσαμε αναστολή της επαγωγής της HR που προκαλείται από τον BnTN2 (Εικ. 25).



Εικόνα 25. Α. Υπερ-έκφραση του υποδοχέα άμυνας TN2 του είδους Brassica napus σε φύλλα Nicotiana benthamiana και σε συν-έκφραση με την πρωτεΐνη AtEXO70B1 και τον βακτηριακό τελεστή XccXopP. Ακόμη, συν-εκφράστηκαν και οι τρεις πλασμιδιακές κατασκευές και μετά από 72 ώρες, εμφανίστηκε HR σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, εκτός από όταν συνεκφράστηκε ο υποδοχέας άμυνας μαζί με την EXO70B1 και σε συν-έκφραση των TN2-EXO70B1-XccXopP. **B**. Έλεγχος αλληλεπίδρασης σε δοκιμασία των δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα μεταξύ των At-/ Bn-TN2 και του βακτηριακού τελεστή XccXopP. Ta δύο αυτά υπό εξέταση ζεύγη δεν αλληλεπίδρασαν, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο στο οποίο απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). **Γ**. Απεικόνιση υπερέκφρασης των πρωτεϊνών At- και Bn-TN2 συγχωνευμένων καρβοξυτελικά με τη YFP πρωτεΐνη σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Και οι δύο πρωτεΐνες εκφράστηκαν και εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα ή/και στην πλασματική μεμβράνη. Κλίμακα 10 μm.

Στη συνέχεια, για να επιβεβαιώσουμε ότι όντως ο *Xcc*XopP δεν προκαλεί την επαγωγή της άμυνας που σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο εξαιτίας του υποδοχέα άμυνας TN2 (Wang et al., 2020; Zhao et al., 2015), 80 δημιουργήσαμε διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis που εκφράζουν τον *Xcc*XopP-YFP και *Xcc*opPP-mCherry, υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της Rubisco του Arabidopsis. Πήραμε φυτά T1 γενιάς από 24 σειρές, από τις οποίες καμία δεν παρουσιάζει φαινότυπο (Εικ. 26A).

Στη βασική άμυνα του φυτού, όταν ένας μεμβρανικός υποδοχέας αναγνωρίσει και προσδεθεί με κάποιο PAMP, επάγει μία σειρά από φυσιολογικές αποκρίσεις με σκοπό τον περιορισμό και τελικά την καταστολή του βακτηρίου. Παρατηρήσαμε προηγουμένως ότι ο XccXopP παρεμβαίνει στη φυσιολογική διαδικασία της εξωκύττωσης, εμποδίζοντας τη διαμεσολαβούμενη από τις ΕΧΟ70Β1 και ΕΧΟ70Β2 μεταφορά του υποδογέα FLS2 στην πλασματική μεμβράνη, αλλά και της PR1a πρωτεΐνης, που σγετίζεται με τη βασική άμυνα του φυτικού κυττάρου. Επιπρόσθετα, θέλαμε να ελέγξουμε κατά πόσο έγει την ικανότητα να παρεμποδίζει την μεταφορά και εναπόθεση καλλόζης στον αποπλαστικό χώρο. Για τον έλεγχο αυτού του φαινομένου, πραγματοποιήσαμε τεχνητή πρόκληση της βασικής άμυνας στα διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν τον XccXopP αλλά και σε φυτά Arabidopsis thaliana αγρίου τύπου. Η επαγωγή έγινε με τη χρήση ενός πεπτιδίου του βακτηριακού μαστιγίου (flg22) σε συγκέντρωση 20 μΜ. Ως αρνητικό μάρτυρα ελέγχου (mock) εμποτίσαμε τα φύλλα μόνο με τον διαλύτη (διάλυμα 10 mM MgCl2). Για το πείραμά μας χρησιμοποιήσαμε τρεις από τις 24 T1 διαγονιδιακές σειρές, τις 15-2, 22-1 και 20-6, οι οποίες φέρουν το διαγονίδιο AtRbsc:: XccXopP-mCherry. Μετά την επαγωγή της άμυνας με το πεπτίδιο flg22, παρατηρήσαμε ότι στις σειρές 15-2 και 22-1, δεν εκκρίθηκε σχεδόν καθόλου καλλόζη, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου φυτά (Εικ. 26Β, Γ). Αντίθετα, στη σειρά 20-6 τα επίπεδα της εκκρινόμενης καλλόζης ήταν περίπου ίδια με τα αντίστοιγα αγρίου τύπου μετά την εφαρμογή του flg22, λαμβάνοντας υπόψη μας και την τυπική απόκλιση (Εικ. 26Β, Γ). Στη συνέχεια, ελέγξαμε την έκφραση του διαγονιδίου μέσω της καρβοξυτελικής mCherry ετικέτας φθορισμού και παρατηρήσαμε σε CLSM ότι υπήρχε ανάποδη συσχέτιση των επιπέδων έκκρισης καλλόζης με τα επίπεδα έκφρασης του XccXopP, όπως φαίνεται από την εικόνα 26B.



Εικόνα 26. Α. Απεικόνιση των φαινοτύπων τριών T1 σειρών διαγονιδιακών φυτών Arabidopsis thaliana, που υπερεκφράζουν τον βακτηριακό τελεστή XccXopP-mCherry υπό την έκφραση του υποκινητή Rubisco του Arabidopsis, σε σχέση με αγρίου τύπου φυτά. Δεν παρατηρήθηκε κάποια φαινοτυπική διαφορά. **B**. Απεικόνιση της έκκρισης καλλόζης σε φυτά αγρίου τύπου και στις T1 διαγονιδιακές σειρές 15-2, 22-1 και 20-6, ύστερα από επαγωγή με 20 uM flg22 ή mock διάλυμα (10 mM MgCl₂). Η παρατήρηση έγινε ύστερα από 12 ώρες επαγωγής σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ανάποδη συσχέτιση της έκκρισης καλλόζης με τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, ύστερα από παρατήρηση σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Κλίμακα 15 μm. Γ. Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκκρισης καλλόζης των αγρίου τύπου και διαγονιδιακών T1 σειρών Arabidopsis thaliana, από το πείραμα που περιγράφηκε στο B.

ii. Αναζήτηση του μοριακού μηχανισμού παθογένειας του XccXopP.

Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο εξωκύττωσης στα φυτά, όπως και στο σακχαρομύκητα και στα θηλαστικά, αποτελείται από οκτώ υπομονάδες,

τις πρωτεΐνες SEC3, SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, EXO70 και EXO84. Στον άνθρωπο και στη ζύμη έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν αρχικά δύο υπό-σύμπλοκα (YΣ-I και YΣ-II), αποτελούμενα από τις υπομονάδες SEC3, SEC5, SEC6, SEC8 και SEC10, SEC15, EXO70, EXO84, αντίστοιχα (Ahmed et al., 2018; Heider et al., 2016; Mei et al., 2018). Συγκεκριμένα, στη ζύμη σχηματίζεται αρχικά ένα διμερές από τις υπομονάδες SEC10 και SEC15, ενώ στη συνέχεια απαιτείται η EXO84 για να προσελκύσουν και την EXO70 και να σχηματιστεί το πλήρες YΣ-II (Mei et al., 2018). Στα φυτά, όμως, ο σχηματισμός των δύο διακριτών υπό-συμπλόκων δεν έχει εξακριβωθεί, παραμένει όμως μία βάσιμη θεωρία (Saeed et al., 2019). Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στο ερώτημα, του κατά πόσο ο *Xcc*XopP στοχεύει μόνο την EXO70 ή εάν έχει κάποιο μεγαλύτερο στόχο, όπως ένα εκ των δύο υπό-συμπλόκων.

Για να ελέγξουμε αυτή τη θεωρία, αρχικά κλωνοποιήσαμε όλα τα μέλη του συμπλόκου εξωκύττωσης του Arabidopsis στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης για τη ζύμη pGADT7, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο cDNA από Arabidopsis. Επίσης, κλωνοποιήσαμε και κάποια παράλογα γονίδια (Sec3A, Sec5A, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15A, Sec15B, Exo84B кал Exo84C). Οι αλληλεπιδράσεις της ΕΧΟ70Β1 με τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου στο Arabidopsis ήταν γνωστές από προηγούμενες εργασίες (Kulich et al., 2013; Zhao et al., 2015), παρόλα αυτά τις επιβεβαιώσαμε κι εμείς με τη γρήση της δοκιμασίας των δύο υβριδίων στο σακγαρομύκητα (Εικ. 27 Α, B, Πίν. 6). Παρατηρήσαμε, ότι η ΕΧΟ70B1 αλληλεπιδρά με τις SEC15B, SEC5A και EXO84B και ασθενέστερα με την SEC3A. Όμως όταν ελέγξαμε τις τρεις τελευταίες αλληλεπιδράσεις σε Υ2Η χρησιμοποιώντας στέλεγος σακγαρομύκητα PJ69, δεν καταφέραμε να δούμε το αλληλεπίδραση (παρά μόνο για το ζεύγος ΕΧΟ70B1-ΕΧΟ84Β μία από τις συνολικά τρεις βιολογικές επαναλήψεις). Στη συνέχεια η αλλαγή στελέχους σακχαρομύκητα και η χρήση του ΑΗ109 βοήθησε να επιβεβαιώσουμε τις αλληλεπιδράσεις. Αυτό κάνει φανερό ένα εκ των μειονεκτημάτων της τεχνικής Υ2Η που είναι η εμφάνιση λανθασμένααρνητικών αποτελεσμάτων. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό γρειάζεται η επανάληψη των αρνητικών αποτελεσμάτων και σε διάφορα στελέχη ώστε να βρεθεί το κατάλληλο στέλεχος του σακχαρομύκητα για κάθε σετ πειραμάτων.

Ακολούθως, επιβεβαιώσαμε όλες τις θετικές αλληλεπιδράσεις και με την χρήση της τεχνικής BiFC σε φυτά Nicotiana benthamiana, όπου παρατηρήσαμε σήμα φθορισμού και για τα τρία ζεύγη που ελέγχθηκαν (Εικ. 27Γ). Στη συνέγεια, εξετάσαμε την πιθανή αλληλεπίδραση του βακτηριακού τελεστή XccXopP (pGBKT7-XccXopP) με κάποια από τα εξωκύττωσης. συμπλόκου μεγάλο μέλη του Mε ενδιαφέρον παρατηρήσαμε σε Y2H ότι ο XccXopP αλληλεπίδρασε και με τις SEC10 και ΕΧΟ84Β υπομονάδες (Εικ. 27 Α, Β, Πίν. 6), οι οποίες μαζί με την ΕΧΟ70Β1 ανήκουν στο ΥΣ-ΙΙ. Επιβεβαιώσαμε τις αλληλεπιδράσεις αυτές και με BiFC αναλύσεις σε φυτά Nicotiana benthamiana (Εικ. 27Γ). Το επόμενο βήμα μας ήταν να ελέγξουμε αν στην αλληλεπίδραση, με τις SEC10 και EXO84B, συμετέχει το αμινοτελικό ή το καρβοξυτελικό άκρο του τελεστή. Ο έλεγχος έγινε με τη χρήση Υ2Η. Στην εικόνα 27Δ παρατηρήσαμε ότι αυτές αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό τμήμα του XccXopP, όπως ακριβώς είχαμε παρατηρήσει και για την EXO70B1. Παρομοίως, ελέγξαμε ποια πρωτεϊνική επικράτεια της ΕΧΟ70Β1 αλληλεπιδρά με τις SEC15B, SEC5A και EXO84B υπομονάδες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας έδειξαν ότι και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό (AB) τμήμα της EXO70B1 (Εικ. 27E), όπως ακριβώς και ο τελεστής XccXopP. Στη συνέχεια, ελέγξαμε τις αλληλεπιδράσεις των λοιπών υπομονάδων του ΥΣ-ΙΙ μεταξύ τους. Παρατηρήσαμε ότι η SEC15B αλληλεπιδρά και με τα τρία μέλη του ΥΣ-ΙΙ σε Υ2Η και BiFC ανάλυση (Εικ. 27 Β,Γ,Ε, Εικ. 29 Α, Β). Τα αποτελέσματα αυτά είναι όμοια με τα αποτελέσματα από Υ2Η αναλύσεις προηγούμενων μελετών (Hála et al., 2008; Picco et al., 2017; Zhao et al., 2015).

Στον Πίνακα 6 φαίνονται συγκεντρωτικά οι αλληλεπιδράσεις των EXO70B1 και *Xcc*XopP με τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου εξωκύττωσης, όπως τις ελέγξαμε σε Y2H και BiFC αναλύσεις. Επιπλέον, ελέγξαμε και εάν η EXO70B1 και ο *Xcc*XopP έχουν την ικανότητα ο καθένας να ομο-διμερίζεται, με τη χρήση Y2H και BiFC ανάλυσης. Παρατηρήσαμε ότι και οι δύο πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον εαυτό τους (Εικ. 28A, B, Πίν. 6).



В CC, NN A

AtEXO70B1+EV AtEXO70B1+AtSec3A AtEXO70B1+AtSec5A AtEXO70B1+AtSec6 AtEXO70B1+AtSec8 AtEXO70B1+AtSec10 AtEXO70B1+AtSec15A AtEXO70B1+AtSec15B AtEXO70B1+AtEXO84B AtEXO70B1+AtEXO84C EVs

Α

Г





BD-BC BD-CD

112

LWA



CC, MA

85

Εικόνα 27. Α. Αλληλεπιδράσεις της ΕΧΟ70Β1 με τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου εξωκύττωσης, συμπεριλαμβανομένου και των παραλόγων πρωτεϊνών SEC15A, SEC15B και EXO84B, EXO84C, μέσω δοκιμασίας των δύο υβριδίων στο σακγαρομύκητα στελέγους AH109. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες SEC5A και EXO84B, καθώς επίσης και ασθενής αλληλεπίδραση με την SEC3A, όπως φάνηκε από το φτωγό θρεπτικό μέσο από όπου απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). B. Αλληλεπιδράσεις της ΕΧΟ70B1 και του βακτηριακού τελεστή XccXopP με τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου εξωκύττωσης, συμπεριλαμβανομένου και των παραλόγων πρωτεϊνών SEC15A, SEC15B και EXO84B, EXO84C, μέσω δοκιμασίας των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα στελέχους PJ694a. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της EXO70B1 με τις πρωτεΐνες SEC15B, καθώς επίσης και αλληλεπίδραση του XccXopP με τις SEC10 και ΕΧΟ84Β, όπως φάνηκε από το φτωγό θρεπτικό μέσο από όπου απουσίαζαν τα στοιγεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). Γ. Επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων, που παρατηρήθηκαν στο A και B, με τη χρήση BiFC ανάλυσης. Οι πρωτεΐνες EXO70B1, SEC10 και EXO84B συγχωνεύτηκαν καρβοξυτελικά με την ετικέτα nVENUS, ενώ οι πρωτεΐνες XccXopP, SEC15B, EXO84B και SEC5A με την ετικέτα cCFP. Ακολούθησε παροδική συνέκφραση των εκάστοτε κατασκευών, που υποδεικνύονται στην εικόνα, σε φύλλα Ν. benthamiana και μετά από τρεις ημέρες υπέρ-έκφρασης παρατηρήθηκε σήμα φθορισμού σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Κλίμακα 10 μm. Δ. Αλληλεπιδράσεις του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού τμήματος του XccXopP με τις πρωτεΐνες EXO84B και SEC10. Τα τμήματα του XccxopP κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGBKT7 και τα Exo84B και Sec10 γονίδια στο φορέα pGADT7. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μόνο με το αμινοτελικό τμήμα του τελεστή και στις δύο περιπτώσεις, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο από όπου απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (A). Ε. Αλληλεπιδράσεις των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων της ΕΧΟ70Β1 με τις πρωτεΐνες SEC15B, EXO84B και SEC5A. Τα τμήματα της Exo70B1 κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGBKT7 και τα Sec15B, Exo84B και Sec5A γονίδια στο φορέα pGADT7. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μόνο με το AB τμήμα της EXO70B1 και στις τρεις περιπτώσεις, όπως φάνηκε από το φτωχό θρεπτικό μέσο από όπου απουσίαζαν τα στοιχεία λευκίνη (L), τρυπτοφάνη (W) και αδενίνη (Α).

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικός πίνακας αλληλεπιδράσεων της ΕΧΟ70B1 και του βακτηριακού τελεστή *Xcc*XopP με τον εαυτό τους, καθώς επίσης και με τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου εξωκύττωσης. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τον έλεγχο σε δοκιμασία των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα και σε BiFC. +: αλληλεπίδραση, -: μη αλληλεπίδραση, *: διμερισμός. + (μικρότερη γραμματοσειρά): ασθενέστερη αλληλεπίδραση.

	ХссХорР	AtEXO70B1
ХссХорР	*	+
AtEXO70B1	+	*
AtSEC3A	-	+
AtSEC5A	-	+
AtSEC6	-	-
AtSEC8	-	-
AtSEC10	+	-
AtSEC15A	-	-
AtSEC15B	-	+
AtEXO84B	+	+
AtEXO84C	-	-



Εικόνα 28. Α. Απεικόνιση διμερισμού των ΕΧΟ70Β1 (κάτω) και XccXopP (πάνω) πρωτεϊνών σε BiFC ανάλυση. Για την BiFC ανάλυση, και τα δύο γονίδια κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης φυτών (pICH86988) με μία καρβοζυτελική ετικέτα nVENUS και cCFP και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε παροδική συν-έκφραση είτε των EXO70B1-nVENUS και EXO70B1-cCFP, είτε των XccXopP-nVENUS και XccXopP-cCFP σε φύλλα N. benthamiana. Μετά από τρεις ημέρες υπέρ-έκφρασης, παρατηρήθηκε σήμα της κίτρινης φθορίζουσας

πρωτεΐνης (YFP). Κλίμακα 15 μm. **B.** Για την ανάλυση Y2H, τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν και στους δύο φορείς έκφρασης για τη ζύμη (pGBKT7 και pGADT7) και μετασχηματίστηκαν σε ζύμη στελέχους PJ694a. Όπως φάνηκε στο θρεπτικό μέσο όπου απουσίαζαν η λευκίνη (L), η τρυπτοφάνη (W) και η αδενίνη (A), τόσο ο *Xcc*XopP όσο και η *At*EXO70B1 σχημάτισαν ομοδιμερή.



Εικόνα 29. Α, Β. Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης SEC15B με τις SEC10 και EXO84B σε BiFC και Y2H αναλύσεις. Α. Για την ανάλυση με BiFC, το γονίδιο Sec15B κλωνοποιήθηκε αμινοτελικά μίας cCFP ετικέτας, ενώ τα Sec10 και Exo84B αμινοτελικά μίας nVenus ετικέτας. Πραγματοποιήθηκαν διπλοί μετασχηματισμοί, όπως φαίνονται στην εικόνα, σε φύλλα N. benthamiana και μετά από τρεις ημέρες παρατηρήθηκε σήμα φθορισμού YFP σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού. Κλίμακα 10 μm. B. Για την ανάλυση σε Y2H, το γονίδιο sec15B κλωνοποιήθηκε στον pGADT7 πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματίστηκε σε ζύμη PJ694a μαζί με τον πλασμιδιακό φορέα pGBKT7:AtSec10 ή pGBKT7:AtExo84B. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν και οι έλεγχοι αυτό-ενεργοποίησης με άδειο φορέα pGADT7. Όπως φάνηκε στο θρεπτικό μέσο όπου απουσίαζαν η λευκίνη, η τρυπτοφάνη και η αδενίνη, και στις δύο περιπτώσεις οι πρωτεΐνες αλληλεπίδρασαν μεταξύ τους, ενώ οι αρνητικοί μάρτυρες ελέγχου δεν έδωσαν ανάπτυξη.

Για να ελέγξουμε την αρχική υπόθεσή μας, εάν δηλαδή ο XccXopP έχει έναν μεγαλύτερο στόχο παρεμβαίνοντας στη δόμηση του συμπλόκου εξωκύττωσης, χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία των τριών υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Y3H). Για το Y3H, κλωνοποιήσαμε το γονίδιο exo70B1 ή το sec15B στη θέση MCS-I του πλασμιδιακού φορέα pBridge και τον XccxopP στη θέση MCS-II του ίδιου φορέα. Τα γονίδια Exo70B1 και Sec15B είναι συγχωνευμένα στο καρβοξυτελικό άκρο της DBD επικράτειας του Gal4 μεταγραφικού παράγοντα και υπό την έκφραση του συστατικού υποκινητή της ζύμης ADH1. Το γονίδιο του XccXopP 88

βρίσκεται υπό την έκφραση του επαγόμενου υποκινητή της μεθειονίνης (MET25), επομένως παρουσία 1 mM μεθειονίνης το γονίδιο δεν εκφράζεται. Ενώ η απουσία του αμινοξέος αυτού από το θρεπτικό μέσο επάγει την έκφρασή του. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε διπλό μετασγηματισμό με τις πλασμιδιακές κατασκευές pBridge: AtExo70B1 *XccXopP* (MCS-II) pGADT7:AtSec5A (MCS-I) και +ή pGADT7:AtExo84B ή pGADT7:AtSec15B (δηλαδή τα μέλη με τα οποία αλληλεπιδρά η ΕΧΟ70Β1) στο στελέχους ΑΗ109 του σακχαρομύκητα. Με το ίδιο σκεπτικό, πραγματοποιήσαμε διπλό μετασχηματισμό με την πλασμιδιακή κατασκευή pBridge: AtSec15B (MCS-I) + XccXopP (MCS-II) και μία εκ των pGADT7:AtExo70B1 ή pGADT7:AtSec10 ή pGADT7:AtExo84B. Επωάσαμε τις αποικίες ζύμης σε φτωχό θρεπτικό μέσο, που απουσίαζε η λευκίνη και η τρυπτοφάνη (-LW), ή, η λευκίνη, η τρυπτοφάνη και η μεθειονίνη (-LWM) ως δοκιμές ελέγχου. Για την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης, απουσία και παρουσία έκφρασης του ΧορΡ, επωάσαμε τις ζύμες σε φτωχό θρεπτικό μέσο που απουσίαζε η λευκίνη, η τρυπτοφάνη και η αδενίνη (-LWA) ή, η λευκίνη, η τρυπτοφάνη, η αδενίνη και η μεθειονίνη (-LWAM), αντίστοιχα. Παρατηρήσαμε πως ο *Xcc*XopP ανέστειλε την αλληλεπίδραση μεταξύ της *At*EXO70B1 και των AtSEC5A και AtSEC15B (Εικ. 30), ενώ δεν μπορέσαμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα ως προς την αλληλεπίδραση μεταξύ της AtEXO70B1 και της AtEXO84B, καθώς σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε, μεγάλωσε και ο αρνητικός μάρτυρας ελέγχου. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι ο XccXopP ανέστειλε ισχυρά την αλληλεπίδραση μεταξύ των SEC10 και SEC15B (Εικ. 30).

pMET :: XopP	BD- EXO70 B1	BD- AtSEC 15B	AD- <i>At</i> SEC 15B	AD- EXO70 B1	AD- <i>At</i> SEC5A	AD- <i>At</i> SEC 10	BD (EV)	AD (EV)				
+	+	-	-	-	-	-	-	+		۲	٢	0
+	+	-	-	-	+	-	-	-				
+	+	-	+	-	-	-	-	-				0
+	-	-	-	-	-	-	-	+			Ì	
+	-	+	-	-	-	-	-	+				Ø
+	-	+	-	-	-	+	-	-				
									, jh	inn	INA	INAM

Εικόνα 30. Y3H ανάλυση των διαφόρων υπομονάδων του συμπλόκου εξωκύττωσης, απουσία και παρουσία έκφρασης του τελεστή *Xcc*XopP. Η πλασμιδιακή κατασκευή pBridge: *At*Exo70B1 (MCS I) + pMET::*Xcc*XopP (MCS II) μετασχηματίστηκε σε ζύμη στελέχους AH109 μαζί με τις πλασμιδιακές κατασκευές pGADT7: *At*Sec5A (2^η σειρά) ή pGADT7: *At*Sec15B (3^η σειρά) ή με άδειο φορέα (αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, 1^η σειρά). Επιπλέον, η πλασμιδιακή κατασκευή pBridge: *At*Sec15B (MCS I) + pMET::*Xcc*XopP (MCS II) μετασχηματίστηκε σε ζύμη στελέχους AH109 μαζί με τις πλασμιδιακές κατασκευές pGADT7: *At*Sec10 (6^η σειρά) ή με άδειο φορέα (αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, 5^η σειρά). Τέλος μετασχηματίστηκαν και ο άδειος φορέας pBridge: - (MCS I) + pMET::*Xcc*XopP μαζί με τον άδειο φορέα pGADT7 ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου (3^η σειρά). Από όλους τους μετασχηματισμούς, παρατηρήθηκε Y2H αλληλεπίδραση μεταξύ των ζευγών ΕΧΟ70B1-SEC15B, EXO70B1-SEC5A και SEC15B-SEC10, όπως φάνηκε από το θρεπτικό μέσο –LWA (χωρίς λευκίνη, τρυπτοφάνη και αδενίνη), ενώ και οι τρεις αυτές αλληλεπιδράσεις παρεμποδίστηκαν από το βακτηριακό τελεστή *Xcc*XopP, όπως φάνηκε από το θρεπτικό μέσο –LWAM (χωρίς λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη και μεθειονίνη).

Η πρωτεΐνη RIN4 (<u>RPM1-INTERACTING PROTEIN4</u>) του Arabidopsis έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την EXO70B1 και την μεταφέρει στην πλασματική μεμβράνη. Ο τελεστής, όμως της Ψευδομονάδας AvrRpt2 κόβει την RIN4, με αποτέλεσμα οι αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες να παραμένουν στο κυτταρόπλασμα (Sabol et al., 2017). Για να ελέγξουμε εάν ο *Xcc*XopP διαταράσσει την αλληλεπίδραση των δύο παραπάνω πρωτεϊνών, πραγματοποιήσαμε ανάλυση Y3H μεταξύ των *At*EXO70B1, *Xcc*XopP και *At*RIN4. Τρεις ημέρες μετά, από την ανάπτυξη της ζύμης, διαπιστώσαμε ότι οι πρωτεϊνες EXO70B1 και RIN4 συνεχίσαν να αλληλεπιδρούν και η αλληλεπίδραση τους δε διαταράχθηκε από την παρουσία του *Xcc*XopP, όπως φάνηκε στο φτωχό θρεπτικό μέσον όπου απουσιάζουν τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη και μεθειονίνη (Εικ. 31).



Εικόνα 31. Y3Η ανάλυση των πρωτεϊνών EXO70B1 και RIN4 του Arabidopsis, απουσία και παρουσία έκφρασης του τελεστή XccXopP. Η πλασμιδιακή κατασκευή pBridge: AtExo70B1 (MCS I) + pMET::XccXopP (MCS II) μετασχηματίστηκε σε ζύμη στελέχους AH109 μαζί με την πλασμιδιακή κατασκευή pGADT7:AtRIN4 (2^η σειρά), καθώς επίσης και οι κατάλληλοι μάρτυρες αρνητικού ελέγχου (1^η, 3^η, 4^η και 5^η σειρές), που απεικονίζονται στην εικόνα. Από όλους τους μετασχηματισμούς, παρατηρήθηκε Y2H αλληλεπίδραση μεταξύ των ζευγών EXO70B1-RIN4, όπως φάνηκε από το θρεπτικό μέσο –LWA (χωρίς λευκίνη, τρυπτοφάνη και αδενίνη), ενώ η αλληλεπίδραση αυτή δεν παρεμποδίστηκε από τον XccXopP όπως φάνηκε από το θρεπτικό μέσο –LWAM (χωρίς λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη).

Συζήτηση

Τόσο οι μηχανισμοί παθογένειας των μικροβίων όσο και οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας του ξενιστή, φαίνεται να είναι σημαντικά συντηρημένοι στα διαφορετικά βασίλεια των ευκαρυωτικών οργανισμών. Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή προσπαθήσαμε να εξιχνιάσουμε κάποιους από τους μηχανισμούς αυτούς, χρησιμοποιώντας ως εργαστηριακό μοντέλο φυτικά είδη. Μία ομάδα ευκαρυωτικών οργανισμών που έχει αρκετά πλεονεκτήματα στην εργαστηριακή χρήση τους, αλλά και πολύ λιγότερα ηθικά προβλήματα συγκριτικά με την χρήση των ζωικών εργαστηριακών μοντέλων.

Χρησιμοποιώντας ενσωματωμένες σε NLR υποδοχείς πρωτεϊνικές επικράτειες (IDs), ως εργαλείο εύρεσης νέων στόχων των μικροβιακών τελεστών, καταφέραμε να ανακαλύψουμε αρκετές νέες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των IDs με συντηρημένους τελεστές. Για τους τελεστές αυτούς δεν είχε δειχθεί προηγουμένως στην βιβλιογραφία κάποιος πιθανός στόχος στα κύτταρα του ξενιστή. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων μας, αποκάλυψαν πως υπάρχουν τελεστές που έχουν παραπάνω του ενός υποκυτταρικούς στόχους, όπως για παράδειγμα ο *Xcc*XopP, ο *Xcv*XopO και ο *Psp*AvrRps4 (Πίν. 7). Επίσης είδαμε ότι τελεστές χωρίς φυλογενετικές ομοιότητες που εκκρίνονται από διαφορετικά παθογόνα, στοχεύουν τον ίδιο κυτταρικό στόχο (Πίν. 7), όπως είχε προταθεί και στη βιβλιογραφία (Khan et al., 2018; Mukhtar et al., 2011). Πίνακας 7. Συγκεντρωτική απεικόνιση των διαφορετικών στόχων που έχουν οι τελεστές στα κύτταρα του ξενιστή. Ορισμένοι τελεστές έχουν παραπάνω από έναν στόχο, όπως συμβαίνει για τους *XcvXopO*, *XccXopP* και *PspAvrRps4* και επιπλέον, πολλοί τελεστές από διαφορετικά παθογόνα στοχεύουν τον ίδιο κυτταρικό στόχο. Με όμοιο χρώμα φαίνεται η κάθε ενσωματωμένη επικράτεια (ID) στους NLR υποδοχείς, και οι τελεστές αποκτούν χρώμα ανάλογα με το ID με το οποίο αλληλεπιδρούν. Στον πίνακα δε συμπεριλαμβάνεται η αλληλεπίδραση του WRKY_RRS1 ID με τον τελεστή *Psp*AvrRps4, το οποίο βρέθηκε από τους (Sarris et al., 2015).

	Hvv	Os	Bn	Bn	Hvv
	WRKYs	WRKYs	TFSIIN	ТСР	EXO70
1. Xcv					
XopO					
2. Xcc					
XopP					
3. <i>Rs</i>					
PopP2					
4. Psp					
AvrRps4					

Οι WRKY πρωτεΐνες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες, που φέρουν την συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων «WRKY» στο μόριο τους, η οποία περιέχει το μοτίβο WRKYGQK και ακολουθείται από ένα μοτίβο Cx4-5Cx22-23HxH ή Cx7Cx23HxC δακτυλίου-ψευδαργύρου. Στα ανώτερα φυτά, οι πρωτεΐνες WRKY κωδικοποιούνται από πολλές οικογένειες με πάνω από 70 μέλη στο Arabidopsis και πάνω από 100 μέλη στο ρύζι. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε πολλούς φυσιολογικούς μηγανισμούς, όπως στην αύξηση και ανάπτυξη, αλλά κυρίως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βασική και στην ειδική άμυνα του φυτού (Chi et al., 2013; Le Roux et al., 2015; Sarris et al., 2015). Ανάλυση με τη χρήση της τεχνικής Y2H, αποκάλυψε ότι η ενσωματωμένη επικράτεια WRKY, σε υποδοχέα NLR από το κριθάρι, που ανήκει στην ομάδα WRKY 30 του Arabidopsis, αλληλεπιδρά με τέσσερις διαφορετικούς τελεστές, ενώ τα WRKY-IDs από το ρύζι και το Arabidopsis αλληλεπιδρούν μόνο με τον έναν από αυτούς. Τα αντίστοιχα IDs ανήκουν στις ομάδες WRKY 26 και 35 το Arabidopsis. Οι σχετικοί NLR-ID υποδοχείς του κριθαριού και του ρυζιού φέρουν δύο ενσωματωμένες επικράτειες WRKY, εκ των οποίων η μία φέρει μεταλλαγή στην συντηρημένη αλληλουχία (είναι WSKY), ενώ στο Arabidopsis ο NLR-ID υποδοχέας (RRS1) φέρει μία μόνο WRKY επικράτεια (Εικ. 32).



Εικόνα 32. Απεικόνιση των ενσωματωμένων επικρατειών WRKY από NLR υποδοχείς του κριθαριού, του ρυζιού και το Arabidopsis. Στο κριθάρι και στο ρύζι, υπάρχουν δύο WRKY επικράτειες, εκ των οποίων η μία φέρει το μοτίβο WSKY (WRKY-WSKY στο κριθάρι και WSKY-WRKY στο ρύζι), ενώ ο υποδοχέας RRS1 του Arabidopsis φέρει μία επικράτεια μόνο WRKY. Η πρόβλεψη των επικρατειών έγιναν με το πρόγραμμα SMART.

Επιπλέον, στον πίνακα 8 παρατηρείται η ομολογία μεταξύ των τριών αυτών ενσωματωμένων επικρατειών. Παρατηρείται πως το OsWRKYs-ID με το AtWRKY-ID έχουν τη μεγαλύτερη ομολογία με το μικρότερο κενό συστοίχισης (Πίν. 8). Αυτό είναι σε αντιστοιχία με το γεγονός ότι και τα δύο IDs (του ρυζιού και του Arabidopsis) αλληλεπιδρούν με τον ίδιο τελεστή (PspAvrRps4).

Πίνακας 8. Πρωτεϊνική ομολογία των ενσωματωμένων επικρατειών WRKY σε NLR υποδοχείς από διαφορετικά είδη φυτών. Η πρωτεϊνική στοίχιση και ομολογία έγινε με το πρόγραμμα DNAMAN.

Πρωτεϊνική ομολογία		HvvWRKYs			OsWRKYs			AtWRKY		
(Two-sequence										
alignment)										
HvvWRKYs	(ομάδα				31,55%	(gap	=	79.49%	(gap	=
WRKY 30)					39,29%)			74,68%)		
OsWRKYs	(ομάδα	31,55%	(gap	=				58,7% (ga	p = 8%)	
WRKY 26)		39,29%)								
<i>At</i> WRKY	(ομάδα	79.49%	(gap	=	58,7% (ga	p = 8%)				
WRKY 35)		74,68%)								
Multiple Alignment		18,	,68%							

Η ενσωματωμένη επικράτεια TFSIIN στον NLR υποδοχέα BnRPR1 (LOC106419748) του φυτού Brassica napus, συμφωνα με το BLASTP που διεξάγαμε, εμφανίζει ομοιότητα με την υπομονάδα 26c του συμπλόκου διαμεσολάβησης (mediator complex) της RNA πολυμεράσης II. Ουσιαστικά το σύμπλοκο αυτό διευκολύνει τη μεταγραφή, αυξάνοντας την αποδοτικότητα ή/και την αναλογία σχηματισμού του συμπλέγματος εκκίνησης της μεταγραφής (preinitiation complex) στους υποκινητές των γονιδίων. Ακόμη, έχει δειχθεί πως ενεργοποιεί τη μεταγραφή στις περιπτώσεις που η πολυμεράση ΙΙ έχει σταματήσει (Mathur et al., 2011). Οι υπομονάδες του συμπλόκου κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: "head", "middle" και "tail" ομάδες. Στα φυτά (μονοκότυλα και δικότυλα) έχουν βρεθεί συνολικά 40 υπομονάδες Med26, εκ των οποίων 3 στο Arabidopsis thaliana και 3 στο Oryza sativa. Συγκεκριμένα, η υπομονάδα αυτή, που αρχικά είγε βρεθεί στα μετάζωα και στην πορεία βρέθηκαν ομόλογές της στα φυτά (Mathur et al., 2011), αναφέρεται πως βοηθάει την επιμήκυνση του RNA μέσω της RNA πολυμεράσης ΙΙ, αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο επιμήκυνσης (Zhai and Li, 2019). Μέσω των Y2H αναλύσεων που πραγματοποιήσαμε στην παρούσα εργασία, εντοπίσαμε την αλληλεπίδραση μεταξύ της TFSIIN ενσωματωμένης επικράτειας και του συντηρημένου βακτηριακού τελεστή ΧορΟ από την Xanthomonas campestris παθότυπο vesicatoria.

Ο XcvXopO αναγνωρίστηκε μαζί με άλλους εφτά T3EPs που υπάρχουν κυρίως σε αυτόν τον παθότυπο της ξανθομονάδας (Potnis et al., 2011). Έχει αναφερθεί ότι φέρει αμινοξική ομολογία 41% με τον τελεστή της ψευδομονάδας AvrRps4 (Roden et al., 2004; Sohn et al., 2009). Και οι δύο φέρουν τη συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία «KRVY», καθώς και ένα συντηρημένο αμινοξύ "R" (R112/R111 για τους τελεστές AvrRps4 και ΧορΟ, αντίστοιχα). Τα αμινοξέα αυτά είναι απαραίτητα για τον τεμαχισμό του τελεστή σε μία μικρότερη μορφή μέσα στο κύτταρο του φυτικού ξενιστή, αλλά όχι στο βακτηριακό κύτταρο ή στο ευκαρυωτικό κύτταρο της ζύμης. Η έκτοπη έκφραση του ΧορΟ, μέσω αγρο-εμποτισμού, σε φυτά της οικογένειας Brassicaceae δεν προκάλεσε αντίδραση υπερευαισθησίας, σε αντίθεση με τον AvrRps4 (Sohn et al., 2009). Επιπλέον, στην βιβλιογραφία έγει αναφερθεί ότι ο ΧορΟ αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TFT10, η οποία ανήκει στην οικογένεια 14-3-3 και έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ενζύμων και συμπλόκων σηματοδότησης σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Έχει δειχθεί επίσης πως ο ΧορΟ καταστέλλει τα συμπτώματα χλώρωσης που εμφανίζουν οι φυτικοί ξενιστές έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο (Dubrow et al., 2018).

Τέλος, οι TCP πρωτεΐνες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν την ανάπτυξη των φυτικών ειδών σε ένα μεγάλο αύρος διαδικασιών, όπως είναι η άνθηση και η μορφολογία του φύλλου (Spears et al., 2019). Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες έχουν βρεθεί μόνο στα φυτά και έχουν πάρει το όνομά του από τα γονίδια TEOSINTE BRANCHED1 του καλαμποκιού (Zea mays), CYCLOIDEA του φυτού «σκυλάκι» (Antirrhinum majus) και τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα PCF του ρυζιού (Oryza sativa).

Αποφασίζοντας να μελετήσουμε εις βάθος την αλληλεπίδραση μεταξύ της EXO70-ID και του XopP από το βακτήριο Xanthomonas campestris παθότυπο campestris, βρήκαμε πως ένας από τους πραγματικούς στόχους του βακτηριακού αυτού τελεστή στα κύτταρα του ξενιστή είναι η EXO70B1 από το Arabidopsis thaliana. Επιβεβαιώσαμε την αλληλεπίδραση αυτή in vivo σε φυτικά κύτταρα με τη χρήση BiFC και co-IP τεχνικών. Δείξαμε πως η αλληλεπίδραση του XccXopP με την AtEXO70

αφορά ένα μικρό υποσύνολο των ΕΧΟ70 παράλογων πρωτεϊνών, καθώς δεν αλληλεπιδρά με την *At*EXO70A1, που παίρνει μέρος στην εξωκύττωση. Επιπλέον, δείξαμε πως και οι δύο πρωτεΐνες (ο βακτηριακός τελεστής και ο φυτικός στόχος του) συν-εντοπίζονται στα ίδια υποκυτταρικά διαμερίσματα, ενώ τόσο ο τελεστής όσο και το σύμπλοκο *Xcc*XopP/EXO70B1 εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Αν και η EXO70B1 του Arabidopsis έχει αναφερθεί να εμπλέκεται στην αυτοφαγία (Kulich et al., 2013), δεν παρατηρήσαμε εντοπισμό του *Xcc*XopP και του συμπλόκου EXO70B1/*Xcc*XopP στα αυτοφαγοσώματα.

Επίσης, με τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών που εκφράζουν κομμάτια των πρωτεϊνών και με τη χρήση της δοκιμασίας των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα, βρήκαμε ότι ο *Xcc*XopP και η *At*EXO70B1 αλληλεπιδρούν από τα αμινοτελικά άκρα των πρωτεϊνών τους. Δείξαμε επίσης, ότι η EXO70B1 αλληλεπιδρά μόνο με τον τελεστή της *Xanthomonas campestris* παθότυπου *campestris* και όχι με άλλους ομόλογους τελεστές. Αντίθετα, ο τελεστής *Xcc*XopP αλληλεπιδρά και με τις παράλογες EXO70B2 και EXO70F1 αλλά όχι την ομόλογή της *At*EXO70B1 από το μονοκοτυλήδονο *Oryza brachyantha*. Κατά την ανάλυση μας εντοπίσαμε μία μετάλλαξη σε ένα αμινοξύ της *Ob*EXO70B1 (K134E), το οποίο είναι αναγκαίο για την αναστολή της.

Η AtEXO70B1 αποτελεί μέλος του συμπλόκου εξωκύττωσης, που έχει βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι εμπλέκεται στην άμυνα έναντι βακτηρίων και μυκήτων (Stegmann et al., 2014), καθώς επίσης και στα αρχικά στάδια της μόλυνσης από PAMPs (Stegmann et al., 2012). Σε μελέτη των (Kulich et al., 2013) ανακαλύφθηκε ένας ρόλος της EXO70B1 στην μεταφορά των ανθοκυανινών στο χυμοτόπιο των φυτικών κυττάρων, μέσω των αυτοφαγοσωμάτων. Στα φυτικά κύτταρα, η EXO70B1 πρωτεΐνη αποδομείται μέσω του 26S πρωτεασώματος μέσω της PUB18 E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης. Η τελευταία ρυθμίζει αρνητικά την κίνηση των κυττάρων που δομούν τα στομάτια, μέσω του αμπσκισικού οξέος (ABA) (Seo et al., 2016). Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο AvrPtoB τελεστής της Ψευδομονάδας (*P. syringae*) ουβικουϊτινώνει την EXO70B1 του Arabidopsis, η οποία έχει

βρεθεί να «φυλάσσεται» από τον μη – τυπικό υποδογέα άμυνας TN2. Ο υποδοχέας αυτός καλέιται μη-τυπικός καθώς δε φέρει LRR επικράτεια στο μόριο του (Zhao et al., 2015). Ο TN2 του Arabidopsis προκαλεί αντίδραση υπεραισθησίας (HR) όταν εκφραστεί εκτοπικά απουσία της AtEXO70B1 στα είδη N. benthamiana και N. tabacum ποικιλίας Xanthi. Η επαγωγή της ΗR εξαφανίζεται σε συνέκφραση του TN2 και της AtEXO70B1, ενώ φαίνεται να επάγεται εκ νέου όταν οι TN2 και AtEXO70B1 συνεκφραστούν με τον AvrPtoB, λόγω της ουβικουιτινίωσης και αποδόμησης της EXO70B1 (Wang et al., 2019c). Στους ευπαθείς ξενιστές ο τελεστής της Ψευδομονάδας ουβικουϊτινώνει και αποδομεί την ΕΧΟ70Β1 και με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιεί προς όφελός του βακτηρίου τη «μηχανή» έκκρισης των κυστιδίων ή την άμυνα. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως η EXO70B1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RIN4 του Arabidopsis, η οποία ανήκει στην οικογένεια των NOI πρωτεϊνών (Nitrate-Induced) και φέρει μία θέση κοπής για τον τελεστή AvrRpt2. Εκτός αυτού, έχει δειχθεί ότι η RIN4 γίνεται στόχος φωσφορυλίωσης ή ριβοσυλίωσης άλλων τελεστών, με σκοπό την καταστολή της PTI (Afzal et al., 2011; Sabol et al., 2017). Στη μελέτη των (Sabol et al., 2017), οι συγγραφείς έδειξαν ότι η RIN4 αλληλεπιδρά με την EXO70B1 και τη μεταφέρει στην πλασματική μεμβράνη. Αντίθετα, όταν η RIN4 γινόταν στόχος του AvrRpt2, και οι δύο αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες παρέμεναν στο κυτταρόπλασμα.

Ο ρόλος του συντηρημένου τελεστή ΧορΡ δεν είναι γνωστός, ούτε υπήρχε πρότερη γνώση της δομής του για να πιθανολογήσουμε το ρόλο του. Παρόλα αυτά, είναι ήδη γνωστό πως αποτελεί σημαντικό παράγοντα παθογένειας της ξανθομονάδας. Συγκεκριμένα, η ερευνητική ομάδα των (Jiang et al., 2009) έδειξε ότι ο *Xcc*XopP (από το στέλεχος 8004) συμβάλλει στην παθογένεια της *Xcc* σε φυτά του είδους *Raphanus sativus* var. *Longipinnatus* της οικογένειας *Brassicaceae*. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώσαμε κι εμείς σε τεχνητές μολύνσεις με το στέλεχος αγρίου τύπου και το μετάλλαγμα *Xcc*^{ΔXopP}. Παράλληλα, ο φυλογενετικά διακριτός τελεστής XopP του ρυζιού (XopP_{Xoo}), έχει δειχθεί ότι καταστέλλει τη βασική άμυνα του ρυζιού μέσω μείωσης των επιπέδων πεπτιδογλυκάνης και χιτίνης, στοχεύοντας ένα θετικό ρυθμιστή της 98 άμυνας, την PUB44 (μία E3 λιγάση ουβικουϊτίνης) (Ishikawa et al., 2014). Επομένως, είναι πιθανόν στο ρύζι, ένα υπόστρωμα της PUB44 να αποτελεί η OsEXO70B1, καθώς όπως αναφέραμε στο Arabidopsis thaliana η EXO70B1 αποδομείται μέσω της PUB18/19. Με τον τρόπο αυτό, ο XopP του παθογόνου του ρυζιού ίσως να καταστέλλει τη βασική άμυνα, στοχεύοντας έμμεσα και όχι άμεσα το σύμπλοκο εξωκύττωσης.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήσαμε, μεταξύ άλλων, τους μηχανισμούς με τους οποίους ο ΧορΡ συνεισφέρει στην παθογένεια της **Xanthomonas** campestris παθοτύπου campestris, μέσω της αλληλεπίδρασης με την EXO70B1 του Arabidopsis. Από τα αποτελέσματά μας, δείξαμε πως ο XccXopP προκαλεί αναστολή της εξωκύττωσης της πρωτεΐνης παθογένειας PR1a σε φυτά N. tabacum (ποικιλιών Petit Gerard και N34/4) και N. benthamiana. Η PR1a αποτελεί μία πρωτεΐνη που εκκρίνεται κατά τη βασική άμυνα, μέσω του συμπλόκου εξωκύττωσης (Du et al., 2015; Gu and Innes, 2012; Hammond-Kosack et al., 1994). Επιπλέον, δείξαμε πως μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης FLS2 στην πλασματική μεμβράνη, η οποία είναι ο διαμεμβρανικός υποδογέας των φυτικών κυττάρων της βακτηριακής φλαγγελίνης (flg-22) (Robatzek et al., 2006). Ο FLS2 μεταφέρεται στη μεμβράνη του κυττάρου μέσω των πρωτεϊνών EXO70B1 και EXO70B2 του συμπλόκου εξωκύττωσης (Wang et al., 2020). Η αλληλεπίδραση του XccXopP με την EXO70B1 ή/και την EXO70B2, οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της FLS2 στην πλασματική μεμβράνη. Επιπλέον, από τα αποτελέσματά μας φάνηκε πως η αλληλεπίδραση του βακτηριακού τελεστή με την ΕΧΟ70B1, σε αντίθεση με τον τελεστή της Ψευδομονάδας AvrPtoB, δεν ενεργοποιεί την άμυνα του φυτού μέσω του υποδοχέα ΤΝ2. Επιβεβαιώσαμε το αποτέλεσμα αυτό και φαινοτυπικά σε διαγονιδιακές σειρές Arabidopsis, οι οποίες κωδικοποιούν για τον υποδοχέα TN2 και τις οποίες τροποποιήσαμε ώστε να εκφράζουν τον XccXopP. Επιπλέον, δείξαμε πως ο μηγανισμός παρεμπόδισης της εξωκύττωσης από το βακτηριακό τελεστή XccXopP, δε συμβαίνει εξαιτίας της αναστολής της αλληλεπίδρασης του ζεύγους RIN4-EXO70B1. Τέλος, δείξαμε στα διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis πως σε σειρές με υψηλή έκφραση του τελεστή, τα επίπεδα έκκρισης της καλλόζης ελαχιστοποιούνται έως και μηδενίζονται. Από όλα τα παραπάνω 99

αποτελέσματα, καταλήγουμε πως η ο συγκεκριμένος τελεστής της Ξανθομονάδας έχει εξελιχθεί ώστε να προκαλεί την παθογένεια στον ξενιστή, αποφεύγοντας να ενεργοποιεί την άμυνα. Αυτό αποτελεί ένα καλό παράδειγμα προσαρμογής του παθογόνου (pathogen's adaptation) το οποίο εξελίσσει στρατηγικές ώστε να αποφεύγει την άμυνα του ξενιστή του. Επίσης, είδαμε ότι η καταστολή δεν είναι λόγω ενζυμικής δράσης του *Xcc*XopP, αλλά μηχανιστική, καταφέρνοντας με αυτόν τον τρόπο να αποφύγει την ενεργοποίηση της PTI άμυνας του ξενιστή.

Σε περαιτέρω αναζήτηση του μοριακού μηγανισμού, με τον οποίο ο XccXopP καταστέλλει τη βασική άμυνα, δείξαμε πως ο στόγος του μέσα στο κύτταρο του ξενιστή πιθανόν δεν είναι μόνο ένα μέλος από το οκταμερές σύμπλοκο εξωκύττωσης. Επιβεβαιώσαμε σε Y2H και BiFC αναλύσεις δύο ακόμη πιθανές αλληλεπιδράσεις με τις SEC10 και EXO84B πρωτεΐνες, οι οποίες μαζί με την ΕΧΟ70Β1 και SEC15B ανήκουν στο υπόσύμπλοκο ΙΙ, στη ζύμη και στα θηλαστικά (Ahmed et al., 2018; Mei et al., 2018). Η ύπαρξη επιμέρους υπό-συμπλόκων δεν έχει επιβεβαιωθεί στα φυτά, παραμένει όμως μία βάσιμη θεωρία. Στη ζύμη και στα θηλαστικά, πριν ακόμη από την δημιουργία των τετραμερών υπό-συμπλόκων, δημιουργούνται διμερή, μέσω αλληλεπιδράσεων των SEC10-SEC15, EXO70-EXO84, SEC3-SEC5 και SEC6-SEC8 υπομονάδων (Ahmed et al., 2018; Mei et al., 2018). Η ένωση των δύο υπό-συμπλόκων έχει υποτεθεί από δομικές αναλύσεις πως πραγματοποιείται μέσω των EXO70-SEC5 υπομονάδων του συμπλόκου εξωκύττωσης (Ahmed et al., 2018; Mei et al., 2018). Μάλιστα, έχουν μελετηθεί εκτενώς σε Υ2Η οι αλληλεπιδράσεις των μελών EXO70B1-EXO84B-SEC10-SEC15B μεταξύ τους (Hála et al., 2008; Kulich et al., 2013; Zhao et al., 2015). Επιβεβαιώσαμε και με τα δικά μας Y2H και BiFC αποτελέσματα ότι η SEC15B αλληλεπιδρά και με τις άλλες τρεις υπομονάδες του υπό-συμπλόκου ΙΙ, ενώ η ΕΧΟ70Β1 αλληλεπιδρά με τις SEC15B και EXO84B, καθώς επίσης και με τη SEC5A από το άλλο υπό-σύμπλοκο (υπό-σύμπλοκο Ι), όπως φαίνεται στην Εικ. 33.



Εικόνα 33. Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μελών του υπό-συμπλόκου ΙΙ (μπλε χρώμα), αλλά και της SEC5A υπομονάδας του υπό-συμπλόκου Ι. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από Y2H και BiFC αναλύσεις. Ελέγχθηκαν και επιβεβαιώθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών που ενώνονται με γραμμές, καθώς επίσης και η αρνητική EXO70B1-SEC10 (δεν ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση SEC10-EXO84B, ούτε οι αλληλεπιδράσεις της SEC5A με τα μέλη του υπό-συμπλόκου ΙΙ, πλην της EXO70B1).

Από τα αποτελέσματα των Υ3Η αναλύσεων, παρατηρήσαμε πως ο *Xcc*XopP καταστέλλει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διμερών SEC15B-SEC10, EXO70B1-SEC15B και EXO70B1-SEC5A. Από αυτές, η καταστολή της πρώτης αλληλεπίδρασης (SEC15B-SEC10) είναι αρκετά ισχυρή.

Ο βακτηριακός τελεστής XccXopP πιθανολογούμε πως δρα ως ένα ενδιάμεσο μόριο στο χώρο, αποτρέποντας να σχηματιστεί το λειτουργικό σύμπλοκο εξωκύττωσης. Η υπόθεση μας αυτή ενισχύεται περαιτέρω και από το γεγονός ότι δεν ενεργοποιεί τον υποδοχέα άμυνας TN2, με αποτέλεσμα να μην επάγονται οι αποκρίσεις άμυνας (HR). Επιπλέον, έχουμε δείξει πως τόσο η EXO70B1 όσο και ο XccXopP σχηματίζουν ομοδιμερή και μάλιστα οι δευτεροταγείς δομές τους, μέσω πρόβλεψης (από την εφαρμογή *in silico* αλγορίθμων) φαίνεται να ομοιάζουν. Επομένως, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το γεγονός ότι ο XccXopP ενδεχομένως να οδηγεί στο σχηματισμό ετερο-διμερών με την EXO70B1, με αποτέλεσμα να διαταράσσει το σχηματισμό των ομο-δι(πολύ)μερών της πρωτεΐνης και εν συνεχεία και τη λειτουργικότητα του συμπλόκου εξωκύττωσης (Εικ. 34).



Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού διατάραξης της φυσιολογίας του φυτικού κυττάρου από τον *Xcc*XopP και καταστολής της εξωκύττωσης, με ταυτόχρονη αποφυγή ενεργοποίησης της άμυνας του κυττάρου-ξενιστή.

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικά είδη

Είδη του γένους Nicotiana

Χρησιμοποιήθηκαν φυτά του γένους Nicotiana benthamiana και Nicotiana tabacum ποικιλιών Petit Gerard, N34-4 και Xanthi, τα οποία μεγάλωσαν σε συνθήκες θερμοκηπίου ή σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών θερμοκρασίας 25 °C, υγρασίας 72% και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι.

Είδη Arabidopsis thaliana

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου του είδους Arabidopsis thaliana, οικοτύπου Columbia-0 (Col-0). Αρχικά, τα σπέρματα μπήκαν σε νερό στους 4 °C για δύο με τρεις ημέρες, για να σπάσει ο λήθαργος, πριν σπαρθούν στο κατάλληλο χώμα και στη συνέχεια μεγάλωσαν σε συνθήκες θερμοκηπίου. Για τη δημιουργία των διαγονιδιακών φυτών, που υπερ-εκφράζουν συστατικά τον βακτηριακό τελεστή *Xcc*XopP, χρησιμοποιήσαμε Col-0 αγρίου τύπου φυτά, τα οποία μετασχηματίστηκαν με τη μέθοδο Floral Dip (Clough and Bent, 1999). Στη συνέχεια, τα διαγονιδιακά πλέον φυτά επιλέχθηκαν μέσω ψεκασμού με BASTA, καθώς το πλασμίδιο έφερε το *Bar* γονίδιο ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα, τα φυτά ηλικίας περίπου έξι έως 7 ημερών (στάδιο ανάπτυξης των κοτυληδόνων) ψεκάστηκαν από μικρή απόσταση με το BASTA (Bayer, 60 ppm Glufosinate – ammonium) δύο φορές μέσα σε μία εβδομάδα (την 1^η και την 4^η μέρα) και στη συνέχεια, τα επιζήσαντα φυτά ελέγχθηκαν και μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Βακτηριακά είδη και στελέχη

Escherichia coli

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε βακτηριακά είδη *E. coli* στελέχους Stellar ή DH10b, τα οποία μεγάλωσαν σε θρεπτικό μέσο LB με την κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικών (Bλ. Παράρτημα I και II) στους 37 °C. Οι εκάστοτε κατασκευές, που δημιουργήθηκαν, διατηρήθηκαν σε LB καλλιέργεια στους 4 °C έως και δύο εβδομάδες και στους -80 °C για διατήρηση επ' άπειρον. Για την προετοιμασία υγρών καλλιεργειών LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε είτε βακτηριακή απόξεση

από το υλικό βαθιάς κατάψυξης (σε περίπτωση που ήταν ελεγμένο) ή επιλογή μοναδιαίας αποικίας από ένα πιάτο στερεής καλλιέργειας και η υγρή καλλιέργεια αφέθηκε να μεγαλώσει στους 37 °C με ανακίνηση στις 200 στροφές το λεπτό (rpm) περίπου για μία ημέρα (16 έως 18 ώρες).

Xanthomonas campestris παθότυπος campestris

Καλλιεργήθηκε αγρίου τύπου ξανθομονάδα Xanthomonas campestris παθότυπος campestris στελέχους 8004 (Xcc8004), όπως επίσης και η μεταλλαγμένη 060E08 (μεταλλαγμένο στέλεχος που υπό-εκφράζει τον XopP) στους 28 °C, σε στερεή καλλιέργεια LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (Jiang et al., 2009).

Agrobacterium tumefasciens

Καλλιεργήθηκαν είδη του αγρό-βακτηρίου A. tumefasciens στελέχους AGL1, C58C1 και GV3101 σε LB στερεή καλλιέργεια με τα κατάλληλα αντιβοτικά στους 28 °C. Οι εκάστοτε κατασκευές, που δημιουργήθηκαν, διατηρήθηκαν σε LB καλλιέργεια στους 4 °C έως και δύο εβδομάδες και στους -80 °C για διατήρηση επ' άπειρον. Για την προετοιμασία υγρών καλλιεργειών LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε είτε βακτηριακή απόξεση από το υλικό βαθιάς κατάψυξης (σε περίπτωση που ήταν ελεγμένο) ή επιλογή μοναδιαίας αποικίας από ένα πιάτο στερεής καλλιέργειας και η υγρή καλλιέργεια αφέθηκε να μεγαλώσει στους 28 °C με ανακίνηση στις 200 στροφές το λεπτό (rpm) περίπου για μία ημέρα από το πιάτο στερεής καλλιέργειας και για δύο ημέρες από το υλικό βαθιάς κατάψυξης.

Κλωνοποίηση και δημιουργία κατασκευών

Για τις περισσότερες κατασκευές, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι ΤΑ και Golden Gate (GG) και οι πολυμεράσες Taq (Minotech, Enzyquest) και Phusion-HF (NEB), αντίστοιχα. Σε σπάνιες περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε η συμβατική κλωνοποίηση με τη χρήση διαφορετικού περιοριστικού ενζύμου σε κάθε άκρη του γονιδίου και του πλασμιδιακού φορέα ή και η μέθοδος της αλληλοεπικαλυπτόμενης PCR (Overlapping PCR, OE) για την εισαγωγή μίας ή περισσοτέρων μεταλλάξεων. Όλες οι κατασκευές, που

δημιουργήθηκαν επιβεβαιώθηκαν ως προς την ορθή αλληλουχία τους μέσω Sanger αλληλούχιση.

Τα περισσότερα IDs (Bλ. Παρ. II, 16-27) ενισχύθηκαν μέσω PCR από τον αρχικό πλασμιδιακό φορέα pDONR221 και εισήχθησαν κωδικόνια λήξης, και άκρα BsaI εκατέρωθεν του γονιδίου, για να εισαχθούν στον τελικό φορέα έκφρασης για τη ζύμη pGBKT7-RFP, ο οποίος είναι συμβατός για κλωνοποίηση μέσω GG και χρησιμοποιείται για την ανάλυση δοκιμασίας των υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Yeast two - Hybrid, Y2H). Όποια γονιδιακή αλληλουχία είχε εσωτερικά θέση/θέσεις αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BsaI, αυτή/ές μεταλλάχθηκαν σιωπηλά (Engler et al., 2008). Συγκεκριμένα, το EXO70 ID αποτελεί ενσωμάτωση του NLR υποδοχέα RGH2 από το κριθάρι (*Hordeum vulgare* υποείδος. *vulgare* της ποικιλίας Baronnesse). Επιπλέον, κάποια άλλα IDs (Bλ. Παρ. 29-35) συντέθηκαν από την εταιρία Synbio Tech, με τα κατάλληλα άκρα BsaI στον πλασμιδιακό φορέα pUC57 (αμπικιλλίνη) και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον τελικό φορέα pGBKT7-RFP για τις Y2H αναλύσεις.

Τα γονίδια AtExo70B1 και AtExo70F1, εφόσον δεν φέρουν ιντρόνια, ενισχύθηκαν μέσω PCR από γενωμικό DNA του Arabidopsis thaliana σε τρία μέρη, "σιωπώντας" τις εσωτερικές θέσεις Bsal. Δημιουργήθηκαν για κάθε γονίδιο δυο κατασκευές είτε με κωδικόνιο λήξης για τη χρήση σε Υ2Η ανάλυση, είτε χωρίς κωδικόνιο λήξης για να ενσωματωθεί καρβοξυτελικά του γονιδίου μία ετικέτα και να κλωνοποιηθεί τελικά στον πλασμιδιακό φορέα pICH86988, για την πραγματοποίηση αναλύσεων σε φυτά. Προτού όμως εισαχθούν στους τελικούς φορείς, κλωνοποιήθηκαν μέσω ΤΑ μεθόδου στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript SC (-) GG [pBSC (-) GG] (αμπικιλλίνη) (δημιουργήθηκε από τη Γλυκερία Μέρμηγκα, postdoc του εργαστηρίου), για τη διατήρηση των γονιδίων με τα άκρα Bsal και τη χρήση τους ανά πάσα στιγμή σε οποιοδήποτε τελικό φορέα χρειάζονται να κλωνοποιηθούν. Το γονίδιο AtExo70B2 ενισχύθηκε μέσω PCR από τον πλασμιδιακή κατασκευή pICH41308-AtExo70B2 με κατάλληλα άκρα BsaI και κωδικόνιο λήξης και κλωνοποιήθηκε στον τελικό φορέα pGBKT7την πραγματοποίηση Υ2Η αναλύσεων. To γονίδιο RFP για

ObExo70B1_small ενισχύθηκε μέσω PCR από cDNA Oryza brachyantha, σε δύο μέρη για τη «σιώπηση» της ενδογενούς θέσης BsaI, προστέθηκαν τα κατάλληλα άκρα BsaI, είτε με κωδικόνιο λήξης και κλωνοποίηση στο φορέα pGBKT7-RFP για τη χρήση σε Y2H, είτε χωρίς κωδικόνιο λήξης για την εισαγωγή καρβοξυτελικά του γονιδίου μίας ετικέτας και κλωνοποίηση στο φορέα pICH86988 και την πραγματοποίηση αναλύσεων σε φυτά. Το γονίδιο ObExo70B1 large ενισχύθηκε μέσω PCR από γενωμικό DNA Oryza brachyantha, αρχικά πολλαπλασιάζοντας το ORF με το 5' UTR και στη συνέγεια, πραγματοποιώντας μία εσωτερική PCR (nested PCR) με τη χρήση εσωτερικού FW εκκινητή. Και για τα δύο γονίδια Ob, τα κομμάτια από τις επιμέρους PCR πρώτα κλωνοποιήθηκαν μέσω TA, σε pBSK (-) GG φορείς. Το γονίδιο AtExo70A1 (και οι δύο ισομορφές του, splice form 1 και splice form 2) ενισχύθηκε μέσω PCR από cDNA Arabidopsis thaliana με τα κατάλληλα άκρα BsaI και κωδικόνιο λήξης και κλωνοποιήθηκε πρώτα σε pBSK (-) GG φορέα, μέσω TA και στη συνέγεια στον τελικό φορέα pGBKT7-RFP. Το γονίδιο AtRin4 ενισχύθηκε μέσω PCR από cDNA Arabidopsis thaliana με τα κατάλληλα άκρα BsaI και κωδικόνιο λήξης και κλωνοποιήθηκε πρώτα σε pBSK (-) GG φορέα, μέσω TA και στη συνέχεια στους τελικούς φορείς pGBKT7-RFP και pGADT7-RFP.

Τα γονίδια των τελεστών από την ξανθομονάδα Xcc, (Bλ. Παρ. II, 1-10), συμπεριλαμβανομένου και του ΧορΡ ενισχύθηκαν μέσω PCR από γενωμικό DNA του είδους Xanthomonas campestris παθότυπο campestris και στελέχους ATCC 33913 (type strain), σε ένα ή σε περισσότερα μέρη «σιώπηση» της/των ενδογενούς/ών θέσης/θέσεων για τη BsaI. Εισήχθησαν τα κατάλληλα άκρα Bsal με κωδικόνιο λήξης και κλωνοποίηση στους φορείς pGADT7-RFP για Y2H αναλύσεις. Ειδικά για τον XccXopP κλωνοποιήθηκε με κωδικόνιο λήξης και στον pGBKT7-RFP, καθώς επίσης και χωρίς κωδικόνιο λήξης, με εισαγωγή καρβοξυτελικά του γονιδίου μίας ετικέτας και κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pICH86988 για την πραγματοποίηση αναλύσεων στα φυτά. Όλα τα επιμέρους τμήματα κλωνοποιήθηκαν πρώτα σε pBSK (-) GG φορείς και στη συνέχεια στους τελικούς φορείς. Επιπλέον, για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών A. thaliana που υπερεκφράζουν τον XccXopP, κλωνοποιήθηκαν με τη σειρά ο ενδογενής υποκινητής της 106

Rubisco (pICH45195), το γονίδιο *XccXopP* χωρίς κωδικόνιο λήξης (pBSK-*Xcc*XopP-1st part & pBSK-*Xcc*XopP-2nd part w/o stop), η ετικέτα YFP (pICSL50005) ή mCherry (pICSL50004) και τέλος η αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής NOS (pICH41421) στον τελικό πλασμιδιακό φορέα pICSL86955OD, με τη χρήση GG.

Τα γονίδια των τελεστών από την ξανθομονάδα Xcv, (Bλ. Παρ. II, 11-12) και συγκεκριμένα οι XcvXopO οι XcvXopS ενισχύθηκαν μέσω PCR από γενωμικό DNA του βακτηρίου Xanthomonas campestris παθότυπο vesicatoria απομόνωσης 5075 και εισήχθησαν τα κατάλληλα άκρα BsaI και κωδικόνια λήξης για την κλωνοποίηση τους στον τελικό φορέα έκφρασης pGADT7-RFP και τη χρήση τους σε Y2H αναλύσεις. Το γονίδιο PopP2 από το είδος Ralstonia solanacearum και το γονίδιο AvrRps4 από το είδος Pseudomonas syringae παθότυπο pisi ενισχύθηκαν μέσω PCR από cDNA της Ralstonia και πλασμιδιακό DNA pICH86988-AvrRps4-cCFP, αντίστοιχα. Και πάλι, εισήχθησαν τα κατάλληλα άκρα BsaI και κωδικόνια λήξης για την κλωνοποίηση τους στον τελικό φορέα έκφρασης pGADT7-RFP και τη χρήση τους στον τελικό φορέα έκφρασης pGADT7-RFP και τη χρήση τους στον τελικό φορέα έκφρασης pGADT7-RFP και τη χρήση τους στον τελικό φορέα έκφρασης pGADT7-RFP και τη χρήση τους σε Y2H αναλύσεις. Επιπλέον, το γονίδιο AvrRps4 ενισχύθηκε μέσω PCR και χωρίς κωδικόνιο λήξης και εισήχθησαν καρβοξυτελικά ετικέτες και κλωνοποιήθηκαν στον τελικό φορέα.

Τα ορθόλογα γονίδια του XccXopP, XopP1 και XopP2 ενισχύθηκαν μέσω PCR από γενωμικό DNA του είδους Xanthomonas oryzae παθότυπο oryzae WHRI 5234 (NCPPB 1585). Τα ορθόλογα γονίδια Hlk3 και XopP ενισχύθηκαν μέσω PCR από γενωμικό DNA της Ralstonia solanacearum GMI1000 και της Acidovorax citrulli, αντίστοιχα. Όλα τα επιμέρους τμήματα που δημιουργήθηκαν μέσω PCR (που φέρουν τα κατάλληλα άκρα BsaI και κωδικόνιο λήξης) κλωνοποιήθηκαν πρώτα στον pBSK (-) GG και στη συνέχεια στον τελικό πλασμιδιακό φορέα pGADT7-RFP για να πραγματοποιηθούν οι Y2H αναλύσεις.

Τα αλληλοεπικαλυπτόμενα τμήματα της *At*EXO70B1 (AB, BC, CD) ενισχύθηκαν μέσω PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την πλασμιδιακή κατασκευή pGBKT7-*AtExo70B1* και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι FW και REV εκκινητές για τα πρωτεϊνικά τμήματα 1-388 (AB), 319-511 (BC) και 389-625 (CD) της *At*EXO70B1, με κατάλληλα άκρα BsaI και κωδικόνιο λήξης. Η πρόβλεψη των τμημάτων

πραγματοποιήθηκε με βάση την ομόλογη και πολύ συγγενική πρωτεΐνη AtEXO70B2 (Teh O.K. et al., 2019). Αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας κατάλληλους FW και REV εκκινητές και εκμαγείο την πλασμιδιακή κατασκευή pGADT7-XccXopP, ενισχύθηκαν μέσω PCR το αμινοτελικό (1-420) και καρβοξυτελικό (421-733) τμήμα του XccXopP. Η πρόβλεψη αμινοτελικό διαχωρισμού καρβοξυτελικό σε και τμήμα πραγματοποιήθηκε μέσω του ClustalW βιοπληροφορικού προγράμματος. Όλα τα τμήματα κλωνοποιήθηκαν αρχικά στο pBSK (-) GG και στη συνέχεια στους τελικούς φορείς pGBKT7-RFP και pGADT7-RFP (όλα τα τμήματα κλωνοποιήθηκαν και στους δύο φορείς) για τις Υ2Η αναλύσεις. Για την κλωνοποίηση του τμήματος του XccXopP χωρίς τα πρώτα 100 αμινοξέα της αλληλουχίας του, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος FW εκκινητής και πολλαπλασιάστηκε εκ νέου το γονίδιο XopP-100 και εισήχθησε πρώτα στον pBSK (-) GG και στη συνέχεια στο φορέα pGADT7-RFP.

Η πλασμιδιακή κατασκευή 35S::PR1sp-Chp7, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, μας δόθηκε από τον Καθηγητή Jane Glazebrook (Lu et al., 2015) και μεταφέρθηκε στη συνέχεια σε AGL-1 αγροβακτήρια για αναλύσεις στα φυτά. Το γονίδιο του τελεστή ΧορQ ενισχύθηκε μέσω PCR χωρίς κωδικόνιο λήξης από το γενωμικό DNA του βακτηρίου Xanthomonas campestris παθότυπο vesicatoria και κλωνοποιήθηκε στο φορέα pBSK (-) GG και στη συνέχεια στον τελικό φορέα pICH86988 μαζί με μία καρβοξυτελική ετικέτα YFP. Για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής PR1sp-RFP-GFP ενισχύθηκε μέσω PCR το εκκριτικό πεπτίδιο της PR1 πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους FW και REV εκκινητές με BsaI άκρα, καθώς επίσης και το γονίδιο rfp με τα κατάλληλα άκρα BsaI και χωρίς κωδικόνιο λήξης. Στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκαν τα επιμέρους τμήματα στον πλασμιδιακό φορέα pBSK (-) GG. Τέλος, κλωνοποιήθηκαν με τη σειρά, μέσω GG στον τελικό πλασμιδιακό φορέα pICSL869000D, ο 35S υποκινητής του ιού του μωσαϊκού του καπνού (35S CaMV, pICSL13002), το εκκριτικό πεπτίδιο PR1sp (pBSK-PR1sp), η RFP (pBSK-RFP w/o stop), η GFP (pICSL50008) και τέλος η αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής NOS (pICH41421). Για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής RFP-GFP, αντίστοιχα, κλωνοποιήθηκαν με τη σειρά μέσω GG στον τελικό πλασμιδιακό φορέα pICH86988, η RFP (pBSK-RFP w/o stop) και η GFP
(pICSL50008). Η πλασμιδιακή κατασκευή FLS2::FLS2-GFP, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, μας δόθηκε από την Dr. Katarzyna Rybak (LMU, Institute of Genetics) σε αγροβακτήριο GV3101. Τα γονίδια *Tn2* ενισχύθηκαν μέσω PCR χωρίς κωδικόνιο λήξης με τα κατάλληλα άκρα BsaI από cDNA *Arabidopsis thaliana* και *Brassica napus* ποικιλίας zs11 και κλωνοποιήθηκαν αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pBSK (-) GG και στη συνέχεια στον τελικό φορέα pICH86988 μαζί με την καρβοξυτελική ετικέτα YFP.

Τα γονίδια των υπόλοιπων μελών του συμπλόκου εξωκύττωσης (Sec3A, Sec5A, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15A, Sec15B, Exo84B and Exo84C) πολλαπλασιάστηκαν από cDNA *Arabidopsis thaliana* με και χωρίς κωδικόνια λήξης με τα κατάλληλα άκρα BsaI και κλωνοποιήθηκαν αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pBSK (-) GG. Στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκαν μέσω GG στους τελικούς φορείς pGBKT7-RFP και pGADT7-RFP (με κωδικόνιο λήξης) για Y2H αναλύσεις και pICH86988 μαζί με καρβοξυτελικές ετικέτες (χωρίς κωδικόνιο λήξης) για πραγματοποίηση αναλύσεων στα φυτά.

Στο φορέα pBridge κλωνοποιήθηκαν στη θέση MCS I τα AtExo70B1 ή AtSec15B γονίδια και στη θέση MCS II το γονίδιο XccXopP. Αρχικά, εισήχθη στη θέση MCS II ο XccXopP με τη χρήση περιοριστικών άκρων NotI-Bgl2. Για το σκοπό αυτό, πολλαπλασιάστηκε το γονίδιο με κατάλληλους εκκινητές (FW-NotI και REV-Bgl2 άκρα), αφού πρώτα «σιωπήθηκαν» οι ενδογενείς θέσεις αναγνώρισης NotI και Bgl2 και ακολούθησε συμβατική κλωνοποίηση. Ακολούθως, το γονίδιο AtExo70B1 ή AtSec15B εισήχθη στη θέση MCS I με τη χρήση περιοριστικών άκρων EcoRI-SmaI ή EcoRI-BamHI, αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό, πολλαπλασιάστηκαν τα γονίδια με κατάλληλους εκκινητές (FW-EcoRI και REV-SmaI ή –BamHI), αφού πρώτα «σιωπήθηκαν» οι ενδογενείς θέσεις BamHI στην περίπτωση του γονιδίου AtSec15B. Ακολούθησε η συμβατική τους κλωνοποίηση και προέκυψαν τελικά οι πλασμιδιακές κατασκευές pBridge: AtExo70B1 + XccXopP και pBridge: AtSec15B + XccXopP.

Όλες οι κατασκευές που δημιουργήθηκαν και μελετήθηκαν σε αναλύσεις στα φυτά (όχι σε Y2H/Y3H αναλύσεις) στην παρούσα εργασία μεταφέρθηκαν σε C58C1 αγροβακτήρια (εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά παραπάνω).

Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας – δείκτης, που χρησιμοποιήθηκε σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού, *Ds*Red-FYVE μας δόθηκε από τον Καθηγητή František Baluška (University of Bonn) σε C58C1 αγροβακτήριο, ενώ οι υπόλοιποι πρωτεϊνικοί μάρτυρες Plasma-Membrane-RFP, Tonoplast-RFP και Ubi10::mCherry::Atg8A::Alli mCherry μας δόθηκαν από τον Dr. Yasin Dagdas (Gregor Mendel Institute of molecular plant biology) σε AGL-1 αγροβακτήρια.

Οι εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό όλων των παραπάνω γονιδίων – τμημάτων γονιδίων, παρουσιάζονται στο Παράρτημα IV, μαζί με το σκοπό, το αναμενόμενο μήκος του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος και τη θερμοκρασία υβριδισμού του εκάστοτε ζεύγους εκκινητών.

Φυλογενετική ανάλυση του XccXopP

Προκειμένου να διερευνηθούν οι ορθόλογες πρωτεΐνες του XccXopP (XCC 1247), αναζητήθηκαν στο KEGG διάφορα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου είδη του γένους Xanthomonas, Ralstonia και Acidovorax. Συνολικά, ευρέθησαν και σημειώθηκαν 73 ορθόλογες αναρτημένες πρωτεΐνες από το KEGG και δύο από πρόσφατη ανάλυση του γονιδιώματος της X. oryzae παθότυπου oryzicola WHRI 5234 (NCPPB 1585) (Michalopoulou et al., 2018). Χρησιμοποιήθηκε ως όριο 24,4 % πρωτεϊνική ομοιότητα. Επιπλέον, για να επιβεβαιωθούν εάν οι αναρτημένες αυτές ορθόλογες πρωτεΐνες είναι όντως ομόλογες με την XCC_1247, πραγματοποιήθηκε μία ανάποδη πρωτεϊνική αναζήτηση στο NCBI για κάθε μία από τις 75 πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Από την αναζήτηση αυτή, αποκλείσαμε 9 πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Τελικά, η στοίχιση των 67 πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μέσω του MEGA5 προγράμματος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, χρησιμοποιώντας το μοντέλο διόρθωσης (Tamura et al., 2011; ZUCKERKANDL and PAULING, 1965).

Y2H and Y3H αναλύσεις

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Y2H) ήταν οι pGBKT7-RFP και pGADT7-RFP, οι οποίοι είναι συμβατοί με τη μέθοδο κλωνοποίησης GG (καναμυκίνη και αμπικιλλίνη, αντίστοιχα). Η πρωτεΐνη RFP, που υπήρχε

στους άδειους πλασμιδιακούς φορείς, ήταν ένας δεύτερος δείκτης επιλογής, εκτός από την επιλογή ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και βρίσκεται μετά από την θέση πρόσδεσης στο DNA ή τη θέση ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα της γαλακτοσιδάσης (Gal4 DBD και Gal4 AD, αντίστοιχα). Κατά την κλωνοποίηση των γονιδίων στους φορείς, η RFP απομακρύνεται και οι αποικίες στο πιάτο στερεής καλλιέργειας από ροζ-κόκκινες αποκτούν λευκό χρώμα. Οι διπλοί μετασχηματισμοί πραγματοποιήθηκαν σε ζύμη στελέχους PJ694a ή ΑΗ109 (αναφέρεται στο κείμενο). Ως αρνητικοί μάρτυρες ελέγχου, γρησιμοποιήθηκαν ο ένας φορέας με το γονίδιο μαζί με τον άλλο άδειο φορέα και το ανάποδο, καθώς επίσης και οι δύο άδειοι φορείς. Κατά το διπλό μετασχηματισμό, χρησιμοποιήθηκαν ως επιλογή οι αυξοτροφίες στα αμινοξέα λευκίνη και τρυπτοφάνη (για τα οποία η ζύμη είναι μεταλλαγμένη και δεν τα παράγει), ενώ ως επιλογή στην ανάλυση γρησιμοποιήθηκε η αδενίνη ως ο πιο ισχυρός μάρτυρας από τα άλλα δύο (αδενίνη, ιστιδίνη και υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση).

Για τις δοκιμασίες των τριών υβριδίων στο σακχαρομύκητα (Yeast Three - <u>H</u>ybrid, Y3H), χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pBridge (Takara), ο οποίος φέρει δύο θέσεις ενσωμάτωσης γονιδίων. Στη μία (MCS I) εισήχθη το γονίδιο της *AtExo70B1* ή της *AtSec15B* καρβοξυτελικά της θέσης πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα Gal4, τα οποία ήταν υπό την έκφραση του συστατικού υποκινητή της ζύμης ADH1 και στην άλλη θέση (MCS II) εισήχθη ο *XccXopP*, υπό την έκφραση του επαγόμενου υποκινητή της μεθειονίνης (MET25). Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας μαζί με τον αντίστοιχο pGADT7 που έφερε το εκάστοτε γονίδιο, μετασχηματίστηκαν σε ζύμη στελέχους AH109.

Οι μετασχηματισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο του οξικού λιθίου (Lithium acetate). Αναλυτικά, ζύμη από προ-καλλιέργεια (μέρα 1) αραιώνεται τη δεύτερη μέρα σε τελική συγκέντρωση $OD_{600} = 0,25$ και όγκο 10 mL για κάθε ζεύγος μετασχηματισμού και αφήνεται να μεγαλώσει στους 28 °C για 3 έως 3,5 ώρες ($OD_{600} = 0,6-0,7$) υπό ανάδευση (200 rpm). Ακολούθως, τα κύτταρα της ζύμης ξεπλένονται με ίσο όγκο νερού και επαναδιαλύονται με οξικό λίθιο συγκέντρωσης 0,1 M και όγκου 100 μL για κάθε ζεύγος μετασχηματισμού. Στη συνέχεια, προστίθενται σε κάθε ζεύγος μετασχηματισμού 240 μL PEG 50% β/ο, 500 ng πλασμιδιακό DNA

από κάθε φορέα, διαλυμένα τελικά σε 75 μL όγκο νερού και 36 μL οξικό λίθιο συγκέντρωσης 1 Μ. Ακολουθεί καλή διάλυση του μίγματος και επώαση στους 28 °C για 25 λεπτά, χωρίς ανάδευση και θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 λεπτά (υδατόλουτρο). Τέλος, οι μετασχηματισμένες ζύμες επαναδιαλύονται με 150-200 μL νερό και επιστρώνονται σε φτωχό θρεπτικό διάλυμα, από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα λευκίνη και τρυπτοφάνη (Βλ. Παρ. Ι). Την 6^η μέρα οι ζύμες που έχουν μεγαλώσει, επιβεβαιώνεται εκ νέου ο γενότυπος τους επομένως επιστρώνονται ξανά σε φτωχό θρεπτικό διάλυμα, από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα λευκίνη και τρυπτοφάνη (streaking). Την 8^η με 9^η μέρα πραγματοποιείται η ανάλυση Y2H ή Y3H.

Για την ανάλυση Υ2Η, επιλέγονται δύο τουλάχιστον μοναδιαίες αποικίες από κάθε πιάτο μετασχηματισμού και επαναδιαλύονται σε νερό, όγκου ανάλογου των πιάτων όπου θα επιστρωθούν. Τελικά, για κάθε ζεύγος μετασχηματισμού και επανάληψης, απλώνεται μία σταγόνα 5 μL σε φτωχό θρεπτικό διάλυμα, από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα λευκίνη και τρυπτοφάνη (-LW) και μία σταγόνα 5 μL σε φτωγό θρεπτικό διάλυμα, από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη και αδενίνη (-LWA). Για τη δημιουργία διαδοχικών αραιώσεων, τοποθετείται υγρή καλλιέργεια σε φτωχό θρεπτικό διάλυμα, από το οποίο απουσιάζουν τα αμινοξέα λευκίνη και τρυπτοφάνη (-LW), από μία μοναδιαία αποικία και την επόμενη μέρα (9^η με 10^η) ρυθμίζεται το OD_{600} σε 0,1-1 και οι αραιωμένες ζύμες ξεπλένονται δις με νερό. Ακολουθεί η επίστρωσή τους όπως παραπάνω με διαδογικές αραιώσεις (3 ή 4). Επιπλέον, η διαδικασία επιλογής μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε πιάτα στερεής καλλιέργειας, που περιλαμβάνουν X-gal, το υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης, που μετατρέπει από λευκό σε μπλε χρώμα τις αποικίες ζύμης, όπου οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν (Βλ. Παρ. Ι).

Για την ανάλυση Y3H, τα βήματα είναι όπως και στην Y2H ανάλυση, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται επιπλέον πιάτα στερεής καλλιέργειας, στα οποία απουσιάζουν τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη και μεθειονίνη (-LWM) και τα αμινοξέα λευκίνη, τρυπτοφάνη, μεθειονίνη και αδενίνη (-LWAM). Οι ζύμες μεγαλώνουν στους 28 °C για έως και 6-7 ημέρες (ανάλογα την πειραματική διαδικασία, όσα περισσότερα αμινοξέα λείπουν από το θρεπτικό διάλυμα, τόσο περισσότερο η ζύμη αργεί να μεγαλώσει).

Υποκυττάριος εντοπισμός/συν-εντοπισμός και BiFC

Για τον υπό-κυτταρικό εντοπισμό (ή συν-εντοπισμό) των διαφόρων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν αγροβακτήρια σε $OD_{600} = 0.5$, τα οποία αγρο-εμποτίστηκαν σε φύλλα φυτών Nicotiana benthamiana. Οι πρωτεϊνικοί δείκτες συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν σε $OD_{600} = 0.4$. Για την ανάλυση με διμοριακή συμπληρωματικότητα φθορισμού (BiFC), τα υπό – εξέταση γονίδια κλωνοποιήθηκαν με μία καρβοξυτελική ετικέτα nVENUS (pCR8-nVenus) και cCFP (pCR8-cCFP), αντίστοιγα, οι οποίες μαζί προκαλούν φθορισμό YFP. Για τον υπο-κυτταρικό (συν-)εντοπισμό, όλα τα αναφερθέντα γονίδια κλωνοποιήθηκαν με τις καρβοξυτελικές ετικέτες eCFP, YFP ή mCherry, εκτός από τους πρωτεϊνικούς δείκτες οι οποίοι μας στάλθησαν έτοιμοι κλωνοποιημένοι με καρβοξυτελικές ή αμινοτελικές ετικέτες (Βλ. Παρ. ΙΙΙ). Οι παρατηρήσεις από τα πειράματα (συν-)εντοπισμού και BiFC παρατηρήθηκαν τρεις ημέρες μετά τον αγροεμποτισμό σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού (Leica SP8, IMBB-FORTH). Χρησιμοποιήθηκε ο φακός νερού 40x και οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα ImageJ. Ακολουθεί πίνακας με τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής, για κάθε χρωστική που χρησιμοποιήθηκε (Πίν. 9). Τα gain ήταν σε ανώτατο όριο 100%. Επιπλέον, για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων φθορισμού GFP της γιμαιρικής πρωτεΐνης FLS2-GFP χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ, στην όπως περιγράφεται ιστοσελίδα https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cellfluorescence-using-imagej.html (ημερομηνία τελευταίας προσπέλασης: 02/02/2021).

Χρωστική	Διέγερση (nm)	Εκπομπή (nm)	
GFP	488	496-520	
YFP	514	520-550	
mCherry	561	593-628	
DsRed	561	573-616	
RFP	561	573-620	
eCFP	405	463-487	
Chlorophyll	561	653-676	

Πίνακας 9. Απεικόνιση των χρωστικών που παρατηρήθηκαν σε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης φθορισμού και τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής τους.

Δοκιμασία Αντίδρασης Υπερευαισθησίας (HR)

Για τη δοκιμασία αντίδρασης υπερευαισθησίας (<u>Hypersensitive Response</u>, HR) των πρωτεϊνών PR1sp-Chp7, παρουσία και απουσία *Xcc*XopP, πραγματοποιήθηκε αγρό-εμποτισμός των παραπάνω κατασκευών σε φύλλα φυτών του είδους *Nicotiana tabacum* ποικιλίας Petit Gerard και N34/4. Τα αγροβακτήρια ήταν σε συγκέντρωση OD₆₀₀ = 0,1:0,4 (PR1sp-Chp7: *Xcc*XopP/GUS). Επιπλέον, για την έκφραση των *At*TN2 ή *Bn*TN2 μαζί με τις πρωτεΐνες *At*EXO70B1 και *Xcc*XopP πραγματοποιήθηκε αγρόεμποτισμός σε συγκέντρωση OD₆₀₀ = 0,5 για κάθε πρωτεϊνική κατασκευή και σε ίση αναλογία σε φύλλα φυτών του είδους *Nicotiana tabacum* ποικιλίας Petit Gerard, N34/4 και Xanthi.

Έκκριση καλλόζης

Για το πείραμα έκκρισης καλλόζης, πραγματοποιήθηκε αγρό-εμποτισμός 20 μM flg22 (Anaspec), διαλυμένη σε 10 mM MgCl₂ ή σκέτου διαλύματος 10 mM MgCl₂ (mock διάλυμα) στα φύλλα 4 εβδομάδων των διαγονιδιακών φυτών Arabidopsis thaliana. Ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου. Τα αγρό-εμποτισμένα φύλλα αφαιρέθηκαν μετά από 12 ώρες. Η χρώση της καλλόζης, η λήψη και η επεξεργασία των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στην εργασία των (Lin Jin, 2017), με μία διαφοροποίηση στην τεγνική αποχρωματισμού. Συγκεκριμένα, ο αποχρωματισμός πραγματοποιήθηκε με διάλυμα 1 οξικού οξέος : 3 αιθανόλης συνολικά για 12 ώρες. Τα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακή μικροσκοπία δείγματα σάρωσης φθορισμού (Leica SP8, IMBB-FORTH) σε φακό 10x και διέγερση της γρωστικής ανιλίνης από τα 405 nm και εκπομπή σε εύρος 490 έως 530 nm. Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Image J. Συνολικά, για τη δημιουργία του διαγράμματος χρησιμοποιήθηκαν 6 φωτογραφίες για κάθε γενότυπο (σειρά) και χειρισμό, ενώ ορισμένα δείγματα με ακραίες τιμές αφαιρέθηκαν από την ποσοτικοποίηση.

Πρωτεϊνική εκχύλιση και συν-κατακρήμνιση

Για την έκφραση των εκάστοτε πρωτεϊνών από φυτά, πραγματοποιήθηκε αγρό-εμποτισμός με συγκέντρωση OD₆₀₀ = 0,5 (για κάθε πλασμιδιακή κατασκευή). Μετά από τρεις ημέρες παροδικής έκφρασης, τα αγρόεμποτισμένα φύλλα αφαιρέθηκαν και λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, ακολούθησε ολική εκχύλιση πρωτεϊνών με διάλυμα λύσης GTEN (Bλ. Παρ. I) (για κάθε 200 mg ιστού προστέθηκε 1 mL διαλύματος λύσης). Ακολούθησε ψυχόμενη φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 12.500 rpm για 10 λεπτά και το καθαρό υπερκείμενο, αφού πέρασε από Miracloth ή άλλα φίλτρα, τοποθετήθηκε σε καθαρούς μικροσωλήνες. Οι πρωτεΐνες επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 4 °C.

Στην περίπτωση της συν-κατακρήμνισης, ακολούθησε επώαση των πρωτεϊνών με αντίσωμα a-FLAG (Sigma, F1804) για δυο ώρες στους 4 °C και εν συνεχεία επώαση με μαγνητικά σφαιρίδια μίγματος A/G (Millipore, LSKMAGAG02) για άλλη μία ώρα στους 4 °C. Ακολούθησαν 4 πλυσίματα με το διάλυμα λύσης GTEN και επαναδιάλυση στα 100 μL.

Για την ολική εκχύλιση πρωτεϊνών από τη ζύμη, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση της ζύμης όγκου 1,5 mL και συγκέντρωσης της καλλιέργειας $OD_{600} = 0,2 - 1$, ξέπλυμα της με νερό και μετά την εκ νέου φυγοκέντριση, επαναδιάλυση με 100 μL διαλύματος λύσης (Bλ. Παρ. I). Αμέσως ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για 5 με 6 λεπτά (Horvath et al., 1994).

Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοστύπωμα κατά Western

Τα πρωτεϊνικά δείγματα, που παρήχθησαν στα φυτά, διαχωρίστηκαν σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό τους μέγεθος, σε πλέγμα ακρυλαμίδης – δις-ακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8% β/ο (Βλ. Παρ. Ι, για τα διαλύματα). Στη συνέγεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Millipore, IPVH85R) (Bλ. Παρ. Ι, για τα διαλύματα) και ακολούθησε η επώαση τους με το διάλυμα proybridismo; y (blocking) 5% β /o yálatoc Regilait, διαλυμένο σε TBS (Βλ. Παρ. Ι), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέγεια, πραγματοποιήθηκε ένα ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση με το πρώτο αντίσωμα a-FLAG ή a-Myc (CST, 2276S), που είγαν παραγθεί σε ποντίκια (mouse), αραίωσης 1:4000 σε διάλυμα TBST με 3% β/ο Regilait (Βλ. Παρ. Ι), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τέσσερα ξεπλύματα με διάλυμα TBST για 5 λεπτά έκαστο σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα a-mouse συζευγμένο με HRP (Horse-Radish Peroxidase) (CST, 7076S) αραίωσης 1:10000 σε διάλυμα TBST με 3% β/ο Regilait, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν και πάλι τέσσερα ξεπλύματα με διάλυμα TBST για 5 λεπτά έκαστο σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθέτηση διαλύματος εμφάνισης (Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate, WBULS0100) για 5 λεπτά στο σκοτάδι. Ακολούθησε εμφάνιση της μεμβράνης σε σύστημα ανίχνευσης κάμερας στο Sapphire Biomolecular Imager (Azure Biosystems).

Τα πρωτεϊνικά δείγματα, που παρήχθησαν σε ζύμη, διαχωρίστηκαν σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με βάση το μοριακό τους μέγεθος, σε πλέγμα ακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10 ή 12% β/ο. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Millipore, IPVH85R) και ακολούθησε η επώαση τους με το διάλυμα προυβριδισμού (blocking) 5% β/ο γάλατος Regilait, διαλυμένο σε TBST (Bλ. Παρ. Ι), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ένα ξέπλυμα της μεμβράνης με TBST για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση με το πρώτο αντίσωμα a-GAL4 DBD (Santa Cruz Biotechnology, sc-510), που είχε παραχθεί σε ποντίκια (mouse), αραίωσης 1:500 σε διάλυμα TBST με 5% β/ο Regilait (Bλ. Παρ. Ι), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα επόμενα βήματα ήταν παρόμοια με τις πρωτεΐνες που παρήχθησαν στα φυτά.

Βιβλιογραφία

Abramovitch, R.B., and Martin, G.B. (2005). AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. FEMS Microbiol. Lett. *245*, 1–8.

Acheampong, A.K., Shanks, C., Cheng, C.Y., Eric Schaller, G., Dagdas, Y., and Kieber, J.J. (2020). EXO70D isoforms mediate selective autophagic degradation of type-A ARR proteins to regulate cytokinin sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *117*, 27034–27043.

Afzal, A.J., da Cunha, L., and Mackey, D. (2011). Separable Fragments and Membrane Tethering of Arabidopsis RIN4 Regulate Its Suppression of PAMP-Triggered Immunity. Plant Cell 23, 3798 LP – 3811.

Ahmed, S.M., Nishida-Fukuda, H., Li, Y., McDonald, W.H., Gradinaru, C.C., and Macara, I.G. (2018). Exocyst dynamics during vesicle tethering and fusion. Nat. Commun. *9*.

Akimoto-Tomiyama, C., Furutani, A., Tsuge, S., Washington, E.J., Nishizawa, Y., Minami, E., and Ochiai, H. (2012). XopR, a type III effector secreted by Xanthomonas oryzae pv. oryzae, suppresses microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in Arabidopsis thaliana. Mol. Plant. Microbe. Interact. 25, 505–514.

An, Q., Ehlers, K., Kogel, K.-H., Van Bel, A.J.E., and Hückelhoven, R. (2006a). Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. New Phytol. *172*, 563–576.

An, Q., Hückelhoven, R., Kogel, K.H., and van Bel, A.J.E. (2006b). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. Cell. Microbiol. *8*, 1009–1019.

An, Q., van Bel, A.J.E., and Hückelhoven, R. (2007). Do Plant Cells Secrete Exosomes Derived from Multivesicular Bodies? Qianli. Plant Signal. Behav. 2, 4–7.

An, S.Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.J., He, Y.Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., et al. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. FEMS Microbiol. Rev. 44, 1–32.

Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1997). A mRNA Signal for the Type III Secretion of Yop Proteins by Yersinia enterocolitica. Science (80-.). 278, 1140 LP – 1143.

Arbeloa, A., Oates, C. V., Marchès, O., Hartland, E.L., and Frankel, G. (2011). Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli type III secretion effector EspV induces radical morphological changes in eukaryotic cells. Infect. Immun. *79*, 1067–1076.

Asaoka, R., Uemura, T., Ito, J., Fujimoto, M., Ito, E., Ueda, T., and Nakano, A. (2013). Arabidopsis RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. Plant J. *73*, 240–249.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. *19*, 455–477.

Barragan, A.C., and Weigel, D. Plant NLR Diversity : The Known Unknowns of Pan-NLRomes A Brief History of Plant NLRs.

Beuder, S., Dorchak, A., Bhide, A., Moeller, S.R., Petersen, B.L., and MacAlister, C.A. (2020). Exocyst mutants suppress pollen tube growth and cell wall structural defects of hydroxyproline O-arabinosyltransferase mutants. Plant J. *103*, 1399–1419.

van der Biezen, E.A., and Jones, J.D. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. Curr. Biol. *8*, R226-7.

Bigeard, J., Colcombet, J., and Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). Mol. Plant *8*, 521–539.

Block, A., Guo, M., Li, G., Elowsky, C., Clemente, T.E., and Alfano, J.R. (2010). The Pseudomonas syringae type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. Cell. Microbiol. *12*, 318–330.

Bogdanove, A.J., Koebnik, R., Lu, H., Furutani, A., Angiuoli, S. V., Patil, P.B., Van Sluys, M.A., Ryan, R.P., Meyer, D.F., Han, S.W., et al. (2011). Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue

specificity of plant pathogenic Xanthomonas spp. J. Bacteriol. 193, 5450–5464.

Bozkurt, T.O., Belhaj, K., Dagdas, Y.F., Chaparro-garcia, A., Wu, C., Cano, L.M., and Kamoun, S. (2015). Rerouting of Plant Late Endocytic Trafficking Toward a Pathogen Interface. Traffic.

Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Caplan, J.L., Tsao, J., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S.P. (2007). A Novel Role for the TIR Domain in Association with Pathogen-Derived Elicitors. PLOS Biol. *5*, e68.

Büttner, D., and Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. Curr. Opin. Plant Biol. *6*, 312–319.

Büttner, D., and Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors. FEMS Microbiol. Rev. *34*, 107–133.

Castañeda, A., Reddy, J.D., El-Yacoubi, B., and Gabriel, D.W. (2005). Mutagenesis of all eight avr genes in Xanthomonas campestris pv. campestris had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. Mol. Plant. Microbe. Interact. *18*, 1306–1317.

Cenens, W., Andrade, M.O., Llontop, E., Alvarez-Martinez, C.E., Sgro, G.G., and Farah, C.S. (2020). Bactericidal type IV secretion system homeostasis in Xanthomonas citri. PLoS Pathog. *16*, 1–24.

Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., et al. (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the Magnaporthe oryzae effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. Plant Cell *25*, 1463–1481.

Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., and Dodds, P.N. (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: The "integrated decoy" hypothesis. Front. Plant Sci. *5*, 1–10.

Chen, Y., Liu, Z., and Halterman, D.A. (2012). Molecular Determinants of Resistance Activation and Suppression by Phytophthora infestans Effector IPI-O. PLOS Pathog. *8*, e1002595.

Chi, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Fan, B., Yu, J.Q., and Chen, Z. (2013). Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. Mol. Plant *6*, 287–300.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1999). Floral dip : a simplified method for

Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. 16, 735–743.

Contento, A.L., and Bassham, D.C. (2012). Structure and function of endosomes in plant cells. J. Cell Sci. *125*, 3511 LP – 3518.

Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gramnegative bacteria: Structural and mechanistic insights. Nat. Rev. Microbiol. *13*, 343–359.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science *284*, 1318–1322.

Cui, Y., He, Y., Cao, W., Gao, J., and Jiang, L. (2018). The multivesicular body and autophagosome pathways in plants. Front. Plant Sci. *871*, 1–10.

Cunnac, S., Bolot, S., Serna, N.F., Ortiz, E., Szurek, B., Noël, L.D., Arlat, M., Jacques, M.A., Gagnevin, L., Carrere, S., et al. (2013). High-quality draft genome sequences of two Xanthomonas citri pv. malvacearum strains. Genome Announc. *1*, 4–5.

Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2019). A pentangular plant inflammasome. Science (80-.). *364*, 31–32.

Das, A., Rangaraj, N., and Sonti, R. V (2009). Multiple adhesin-like functions of Xanthomonas oryzae pv. oryzae are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. Mol. Plant. Microbe. Interact. 22, 73–85.

Daskalov, A., Habenstein, B., Martinez, D., Debets, A.J.M., Sabaté, R., Loquet, A., and Saupe, S.J. (2015). Signal Transduction by a Fungal NOD-Like Receptor Based on Propagation of a Prion Amyloid Fold. PLOS Biol. *13*, e1002059.

Dean, P. (2011). Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. FEMS Microbiol. Rev. *35*, 1100–1125.

Deb, S., Gupta, M.K., Patel, H.K., and Sonti, R. V (2019). Xanthomonas oryzae pv. oryzae XopQ protein suppresses rice immune responses through interaction with two 14-3-3 proteins but its phospho-null mutant

induces rice immune responses and interacts with another 14-3-3 protein. Mol. Plant Pathol. 20, 976–989.

Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y.-D., and Schumacher, K. (2006). Vacuolar H+-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. Plant Cell *18*, 715 LP – 730.

Ding, Y., Wang, J., Lai, J.H.C., Chan, V.H.L., Wang, X., Cai, Y., Tan, X., Bao, Y., Xia, J., Robinson, D.G., et al. (2014). Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals. Mol. Biol. Cell *25*, 412–426.

Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plantĝ€" pathogen interactions. Nat. Rev. Genet. 11, 539–548.

Donkor, E.S. (2013). Sequencing of bacterial genomes: Principles and insights into pathogenesis and development of antibiotics. Genes (Basel). *4*, 556–572.

Donnenberg, M.S. (2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature 406, 768–774.

Dow, J.M., Scofield, G., Trafford, K., Turner, P.C., and Daniels, M.J. (1987). A gene cluster in Xanthomonas campestris pv. campestris required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. Physiol. Mol. Plant Pathol. *31*, 261–271.

Du, Y., Mpina, M.H., Birch, P.R.J., Bouwmeester, K., and Govers, F. (2015). Phytophthora infestans RXLR effector AVR1 interacts with exocyst component Sec5 to manipulate plant immunity. Plant Physiol. *169*, 1975–1990.

Dubrow, Z., Sunitha, S., Kim, J.G., Aakre, C.D., Girija, A.M., Sobol, G., Teper, D., Chen, Y.C., Ozbaki-Yagan, N., Vance, H., et al. (2018). Tomato 14-3-3 proteins are required for Xv3 disease resistance and interact with a subset of xanthomonas euvesicatoria effectors. Mol. Plant-Microbe Interact. *31*, 1301–1311.

Duxbury, Z., Ma, Y., Furzer, O.J., Huh, S.U., Cevik, V., Jones, J.D.G., and Sarris, P.F. (2016). Pathogen perception by NLRs in plants and animals: Parallel worlds. BioEssays *38*, 769–781.

Elias, M., Drdova, E., Ziak, D., Bavlnka, B., Hala, M., Cvrckova, F.,

Soukupova, H., and Zarsky, V. (2003). The exocyst complex in plants. Cell Biol. Int. 27, 199–201.

Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. PLoS One *3*.

EPPO (2020). eppo A1 and A2 pests for recommendation as quarantine pests. p.

Fang, Y., Lin, H., Wu, L., Ren, D., Ye, W., Dong, G., Zhu, L., and Guo, L. (2015). Genome sequence of Xanthomonas sacchari R1, a biocontrol bacterium isolated from the rice seed. J. Biotechnol. *206*, 77–78.

Fenyk, S., Townsend, P., Dixon, C., Spies, G., Campillo, A., Slootweg, E., Westerhof, L., Gawehns, F., Knight, M., Sharples, G., et al. (2015). The Potato Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat (NLR) Immune Receptor Rx1 Is a Pathogen-dependent DNA-deforming Protein. J. Biol. Chem. 290.

Février, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. Curr. Opin. Cell Biol. *16*, 415–421.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science (80-.). *269*, 496–512.

Fujisaki, K., Abe, Y., Ito, A., Saitoh, H., Yoshida, K., Kanzaki, H., Kanzaki, E., Utsushi, H., Yamashita, T., Kamoun, S., et al. (2015). Rice Exo70 interacts with a fungal effector, AVR-Pii, and is required for AVR-Pii-triggered immunity. Plant J. *83*, 875–887.

Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., and Dangl, J.L. (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. Science *269*, 843–846.

Green, E.R., and Mecsas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. Microbiol. Spectr. *4*, 1–32.

Gu, Y., and Innes, R.W. (2012). The KEEP on going protein of arabidopsis regulates intracellular protein trafficking and is degraded during fungal infectionC W OA. Plant Cell 24, 4717–4730.

Gu, Y., Zavaliev, R., and Dong, X. (2017). Membrane Trafficking in

Plant Immunity. Mol. Plant 10, 1026–1034.

Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. EMBO J. *18*, 1071–1080.

Habyarimana, F., and Ahmer, B.M.M. (2013). More evidence for secretion signals within the mRNA of type 3 secreted effectors. J. Bacteriol. *195*, 2117–2118.

Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J.E., et al. (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. Plant Cell 20, 1330–1345.

Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K., and Jones, J.D.G. (1994). Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene Avr9 in tomato seedlings carrying the disease-resistance gene Cf-9. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 10445–10449.

Haney, C.H., Urbach, J.M., and Ausubel, F.M. (2014). Differences and similarities: Innate immunity in plants and animals. Biochem. (Lond). *36*, 40–44.

He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J., and Guo, W. (2007). Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. EMBO J. *26*, 4053–4065.

Heider, M.R., Gu, M., Duffy, C.M., Mirza, A.M., Marcotte, L.L., Walls, A.C., Farrall, N., Hakhverdyan, Z., Field, M.C., Rout, M.P., et al. (2016). Subunit connectivity, assembly determinants and architecture of the yeast exocyst complex. Nat. Struct. Mol. Biol. *23*, 59–66.

Hong, W., and Lev, S. (2014). Tethering the assembly of SNARE complexes. Trends Cell Biol. 24, 35–43.

van der Hoorn, R.A.L., and Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. Plant Cell *20*, 2009 LP – 2017.

Horvath, A., Horvath, A., Riezman, H., and Riezman, H. (1994). Rapid Protein Extraction from. Yeast *1*, 1305–1310.

Huang, Y., Li, T., Xu, T., Tang, Z., Guo, J., and Cai, Y. (2020). Multiple Xanthomonas campestris pv. campestris 8004 type III effectors inhibit

immunity induced by flg22. Planta 252, 88.

Hueck, C.J. (1998). Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 379–433.

Ignatov, A.N., Monakhos, G.F., Djalilov, F.S., and Pozmogova, G. V (2002). Avirulence Gene from Xanthomonas campestris pv. campestris Homologous to the avrBs2 Locus is Recognized in Race-Specific Reaction by Two Different Resistance Genes in Brassicas. Russ. J. Genet. *38*, 1404–1410.

Ishikawa, K., Yamaguchi, K., Sakamoto, K., Yoshimura, S., Inoue, K., Tsuge, S., Kojima, C., and Kawasaki, T. (2014). Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. Nat. Commun. *5*, 1–11.

Jacobs, J.M., Pesce, C., Lefeuvre, P., and Koebnik, R. (2015). Comparative genomics of a cannabis pathogen reveals insight into the evolution of pathogenicity in xanthomonas. Front. Plant Sci. *6*, 1–13.

Jalan, N., Kumar, D., Yu, F., Jones, J.B., Graham, J.H., and Wang, N. (2013). Complete genome sequence of Xanthomonas citri subsp. citri strain AW12879, a restricted-host-range citrus canker-causing bacterium. Genome Announc. *1*, 4–5.

Jeannette L., T., Kofoed, E.M., Daugherty, M.D., Malik, H.S., and Vance, and R.E. (2014). Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes. Mol. Cell *54*, 17–29.

Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L., and Greenberg, J.T. (2007). A J domain virulence effector of Pseudomonas syringae remodels host chloroplasts and suppresses defenses. Curr. Biol. *17*, 499–508.

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J. *19*, 4004–4014.

Jiang, B.-L., He, Y.-Q., Cen, W.-J., Wei, H.-Y., Jiang, G.-F., Jiang, W., Hang, X.-H., Feng, J.-X., Lu, G.-T., Tang, D.-J., et al. (2008). The type III secretion effector XopXccN of Xanthomonas campestris pv. campestris is required for full virulence. Res. Microbiol. *159*, 216–220. Jiang, W., Jiang, B. Le, Xu, R.Q., Huang, J.D., Wei, H.Y., Jiang, G.F., Cen, W.J., Liu, J., Ge, Y.Y., Li, G.H., et al. (2009). Identification of six type III effector genes with the pip box in xanthomonas campestris pv. campestris and five of them contribute individually to full pathogenicity. Mol. Plant-Microbe Interact. *22*, 1401–1411.

Jin, M.S., and Lee, J.-O. (2008). Structures of TLR-ligand complexes. Curr. Opin. Immunol. *20*, 414–419.

Jo, S.H., Lee, J., Park, E., Kim, D.W., Lee, D.H., Ryu, C.M., Choi, D., and Park, J.M. (2019). A human pathogenic bacterium Shigella proliferates in plants through adoption of type III effectors for shigellosis. Plant Cell Environ. *42*, 2962–2978.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature 444, 323–329.

Kalmbach, L., Hématy, K., De Bellis, D., Barberon, M., Fujita, S., Ursache, R., Daraspe, J., and Geldner, N. (2017). Transient cell-specific EXO70A1 activity in the CASP domain and Casparian strip localization. Nat. Plants *3*, 1–9.

Kapos, P., Devendrakumar, K.T., and Li, X. (2019). Plant NLRs: From discovery to application. Plant Sci. 279, 3–18.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J. (2016). Trabajo práctico Nº 13 . Varianzas en función de variable independiente categórica. Nat. Protoc. *10*, 845–858.

Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2018). Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. Plant J. *93*, 651–663.

Kim, H., O'Connell, R., Maekawa-Yoshikawa, M., Uemura, T., Neumann, U., and Schulze-Lefert, P. (2014). The powdery mildew resistance protein RPW8.2 is carried on VAMP721/722 vesicles to the extrahaustorial membrane of haustorial complexes. Plant J. *79*, 835–847.

Kim, J.-G., Li, X., Roden, J.A., Taylor, K.W., Aakre, C.D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., et al. (2009). Xanthomonas T3S Effector XopN Suppresses PAMP-Triggered Immunity and Interacts with a Tomato Atypical Receptor-Like Kinase and TFT1. Plant Cell *21*, 1305–1323. Kimbrel, J.A., Givan, S.A., Temple, T.N., Johnson, K.B., and Chang, J.H. (2011). Genome sequencing and comparative analysis of the carrot bacterial blight pathogen, Xanthomonas hortorum pv. carotae M081, for insights into pathogenicity and applications in molecular diagnostics. Mol. Plant Pathol. *12*, 580–594.

Koonin, E. V, and Aravind, L. (2000). The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. Trends Biochem. Sci. 25, 223–224.

Koonin, E. V., Mushegian, A.R., and Rudd, K.E. (1996). Sequencing and analysis of bacterial genomes. Curr. Biol. *6*, 404–416.

Kulich, I., Pečenková, T., Sekereš, J., Smetana, O., Fendrych, M., Foissner, I., Höftberger, M., and Žárský, V. (2013). Arabidopsis Exocyst Subcomplex Containing Subunit EXO70B1 Is Involved in Autophagy-Related Transport to the Vacuole. Traffic *14*, 1155–1165.

Kulich, I., Vojtíková, Z., Glanc, M., Ortmannová, J., Rasmann, S., and Žárský, V. (2015). Cell Wall Maturation of Arabidopsis Trichomes Is Dependent on Exocyst Subunit EXO70H4 and Involves Callose Deposition. Plant Physiol. *168*, 120 LP – 131.

Kulich, I., Vojtíková, Z., Sabol, P., Ortmannová, J., Neděla, V., Tihlaříková, E., and Zárský, V. (2018). Exocyst subunit EXO70H4 has a specific role in callose synthase secretion and silica accumulation. Plant Physiol. *176*, 2040–2051.

Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., et al. (2005). The genome sequence of Xanthomonas oryzae pathovar oryzae KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Res. *33*, 577–586.

Leipe, D.D., Koonin, E. V, and Aravind, L. (2004). STAND, a Class of P-Loop NTPases Including Animal and Plant Regulators of Programmed Cell Death: Multiple, Complex Domain Architectures, Unusual Phyletic Patterns, and Evolution by Horizontal Gene Transfer. J. Mol. Biol. *343*, 1–28.

Li, S., van Os, G.M.A., Ren, S., Yu, D., Ketelaar, T., Emons, A.M.C., and Liu, C.M. (2010). Expression and functional analyses of EXO70 genes in arabidopsis implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis. Plant Physiol. *154*, 1819–1830.

Li, S., Chen, M., Yu, D., Ren, S., Sun, S., Liu, L., Ketelaar, T., Emons, A.-M.C., and Liu, C.-M. (2013). EXO70A1-mediated vesicle trafficking is critical for tracheary element development in Arabidopsis. Plant Cell *25*, 1774–1786.

Li, S., Wang, Y., Wang, S., Fang, A., Wang, J., Liu, L., Zhang, K., Mao, Y., and Sun, W. (2015). The Type III Effector AvrBs2 in Xanthomonas oryzae pv. oryzicola Suppresses Rice Immunity and Promotes Disease Development. Mol. Plant. Microbe. Interact. *28*, 869–880.

Liao, Z.-X., Li, J.-Y., Mo, X.-Y., Ni, Z., Jiang, W., He, Y.-Q., and Huang, S. (2020). Type III effectors xopN and avrBS2 contribute to the virulence of Xanthomonas oryzae pv. oryzicola strain GX01. Res. Microbiol. *171*, 102–106.

Lin Jin, D.M.M. (2017). Measuring Callose Deposition, an Indicator of Cell Wall Reinforcement, During Bacterial Infection in Arabidopsis. Methods Mol. Biol. *1578*, 195–205.

Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M.A., White, F.F., Ryan, R.P., Dow, J.M., Rabinowicz, P., Salzberg, S.L., Leach, J.E., Sonti, R., et al. (2008). Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in Xanthomonas. PLoS One *3*.

Lu, Y., Hatsugai, N., Katagiri, F., Ishimaru, C.A., and Glazebrook, J. (2015). Putative serine protease effectors of clavibacter michiganensis induce a hypersensitive response in the apoplast of nicotiana species. Mol. Plant-Microbe Interact. *28*, 1216–1226.

Mackey, D., Holt III, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L. (2002). RIN4 Interacts with Pseudomonas syringae Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis. Cell *108*, 743–754.

Majander, K., Anton, L., Antikainen, J., Lång, H., Brummer, M., Korhonen, T.K., and Westerlund-Wikström, B. (2005). Extracellular secretion of polypeptides using a modified Escherichia coli flagellar secretion apparatus. Nat. Biotechnol. *23*, 475–481.

Malukani, K.K., Ranjan, A., Hota, S.J., Patel, H.K., and Sonti, R. V. (2020). Dual activities of receptor-like kinase OsWAKL21.2 induce immune responses. Plant Physiol. *183*, 1345–1363.

Marković, V., Cvrčková, F., Potocký, M., Pejchar, P., Kollárová, E., Kulich, I., Synek, L., and Žárský, V. (2019). EXO70A2 is critical for the exocyst complex function in Arabidopsis pollen. BioRxiv 831875.

Martin-Urdiroz, M., Deeks, M.J., Horton, C.G., Dawe, H.R., and Jourdain, I. (2016). The exocyst complex in health and disease. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 1–22.

Mathur, S., Vyas, S., Kapoor, S., and Tyagi, A.K. (2011). The mediator complex in plants: Structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (Arabidopsis) and a monocot (Rice) during reproduction and abiotic stress. Plant Physiol. *157*, 1609–1627.

Medina, C.A., Reyes, P.A., Trujillo, C.A., Gonzalez, J.L., Bejarano, D.A., Montenegro, N.A., Jacobs, J.M., Joe, A., Restrepo, S., Alfano, J.R., et al. (2018). The role of type III effectors from Xanthomonas axonopodis pv. manihotis in virulence and suppression of plant immunity. Mol. Plant Pathol. *19*, 593–606.

Mei, K., Li, Y., Wang, S., Shao, G., Wang, J., Ding, Y., Luo, G., Yue, P., Liu, J.J., Wang, X., et al. (2018). Cryo-EM structure of the exocyst complex. Nat. Struct. Mol. Biol. 25, 139–146.

Mermigka, G., and Sarris, P.F. (2019). The Rise of Plant Resistosomes. Trends Immunol. *40*, 670–673.

Mermigka, G., Amprazi, M., Mentzelopoulou, A., Amartolou, A., and Sarris, P.F. (2020). Plant and Animal Innate Immunity Complexes: Fighting Different Enemies with Similar Weapons. Trends Plant Sci. 25, 80–91.

Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., and Young, N.D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J. *20*, 317–332.

Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W. (2003). Genome-Wide Analysis of NBS-LRR–Encoding Genes in Arabidopsis. Plant Cell *15*, 809 LP – 834.

Michalopoulou, V.A., Vicente, J.G., Studholme, D.J., and Sarris, P.F. (2018). Draft Genome Sequences of Pathotype Strains for Three Pathovars Belonging to Three Xanthomonas Species . Microbiol. Resour. Announc. *7*, 4–5.

Michalopoulou, V.A., Kotsaridis, K., and Mermigka, G. (2020). The host exocyst complex is targeted by a conserved bacterial type III effector protein that promotes virulence. BioRxiv 1–32.

Midha, S., Ranjan, M., Sharma, V., Pinnaka, A.K., and Patil, P.B. (2012). Genome sequence of xanthomonas citri pv. Mangiferaeindicae strain LMG 941. J. Bacteriol. *194*, 3031.

Minas, K., McEwan, N.R., Newbold, C.J., and Scott, K.P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. FEMS Microbiol. Lett. *325*, 162–169.

Mukhtar, M.S., Carvunis, A., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M.T., et al. (2011). Plant Immune System Network. Science (80-.). *333*, 596–601.

Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C., and Bogdanove, A.J. (2006). Xanthomonas oryzae pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. *7*, 303–324.

Nishida-Fukuda, H. (2019). The Exocyst: Dynamic Machine or Static Tethering Complex? BioEssays *41*, 1–5.

Oblessuc, P.R., Matiolli, C.C., and Melotto, M. (2020). Novel molecular components involved in callose-mediated Arabidopsis defense against Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7. BMC Plant Biol. 20, 16.

Ochiai, H., Inoue, Y., Takeya, M., Sasaki, A., and Kaku, H. (2005). Genome Sequence of Xanthomonas oryzae pv. oryzae Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity. Japan Agric. Res. Q. JARQ *39*, 275– 287.

Ogura, T., Goeschl, C., Filiault, D., Mirea, M., Slovak, R., Wolhrab, B., Satbhai, S.B., and Busch, W. (2019). Root System Depth in Arabidopsis Is Shaped by EXOCYST70A3 via the Dynamic Modulation of Auxin Transport. Cell *178*, 400-412.e16.

Okuyama, Y., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida, K., Tamiru, M., Saitoh, H., Fujibe, T., Matsumura, H., Shenton, M., Galam, D.C., et al. (2011). A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. Plant J. 66, 467-479.

Ostertag, M., Stammler, J., Douchkov, D., Eichmann, R., and Hückelhoven, R. (2013). The conserved oligomeric Golgi complex is involved in penetration resistance of barley to the barley powdery mildew fungus. Mol. Plant Pathol. *14*, 230–240.

Palmer, T., Finney, A.J., Saha, C.K., Atkinson, G.C., and Sargent, F. (2020). A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. Mol. Microbiol. 1–11.

Pan, Q., Wendel, J., and Fluhr, R. (2000). Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. J. Mol. Evol. *50*, 203–213.

Pečenková, T., Marković, V., Sabol, P., Kulich, I., and Zárský, V. (2017). Exocyst and autophagy-related membrane trafficking in plants. J. Exp. Bot. *69*, 47–57.

Pečenková, T., Potocká, A., Potocký, M., Ortmannová, J., Drs, M., Janková Drdová, E., Pejchar, P., Synek, L., Soukupová, H., Žárský, V., et al. (2020). Redundant and Diversified Roles Among Selected Arabidopsis thaliana EXO70 Paralogs During Biotic Stress Responses. Front. Plant Sci. 11, 1–14.

Peenková, T., Hála, M., Kulich, I., Kocourková, D., Drdová, E., Fendrych, M., Toupalová, H., and Žárský, V. (2011). The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. J. Exp. Bot. *62*, 2107–2116.

Picco, A., Irastorza-Azcarate, I., Specht, T., Böke, D., Pazos, I., Rivier-Cordey, A.S., Devos, D.P., Kaksonen, M., and Gallego, O. (2017). The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis for Exocytosis. Cell *168*, 400-412.e18.

Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A., et al. (2009). The complete genome sequence of Xanthomonas albilineans provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. BMC Genomics *10*, 616.

Popov, G., Fraiture, M., Brunner, F., and Sessa, G. (2016). Multiple xanthomonas euvesicatoria type III Effectors Inhibit flg22-Triggered immunity. Mol. Plant-Microbe Interact. *29*, 651–660.

Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M.T., et al. (2011). Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. BMC Genomics *12*.

Qin, J., Zhou, X., Sun, L., Wang, K., Yang, F., Liao, H., Rong, W., Yin, J., Chen, H., Chen, X., et al. (2018). The Xanthomonas effector XopK harbours E3 ubiquitin-ligase activity that is required for virulence. New Phytol. 220, 219–231.

Redditt, T.J., Chung, E.H., Karimi, H.Z., Rodibaugh, N., Zhang, Y., Trinidad, J.C., Kim, J.H., Zhou, Q., Shen, M., Dangl, J.L., et al. (2019). AvrRpm1 Functions as an ADP-Ribosyl Transferase to Modify NOI Domain-Containing Proteins, Including Arabidopsis and Soybean RPM1-Interacting Protein4. Plant Cell *31*, 2664–2681.

Robatzek, S. (2007). Vesicle trafficking in plant immune responses. Cell. Microbiol. *9*, 1–8.

Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. Genes Dev. *20*, 537–542.

Roden, J.A., Belt, B., Ross, J.B., Tachibana, T., Vargas, J., and Mudgett, M.B. (2004). A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during Xanthomonas infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 16624–16629.

Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., and Martin, G.B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. Nature *448*, 370–374.

Roux, B., Bolot, S., Guy, E., Denancé, N., Lautier, M., Jardinaud, M.F., Fischer-Le Saux, M., Portier, P., Jacques, M.A., Gagnevin, L., et al. (2015). Genomics and transcriptomics of Xanthomonas campestris species challenge the concept of core type III effectome. BMC Genomics *16*.

Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Trémousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levaillant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., et al. (2015). A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. Cell *161*, 1074–1088.

Ryan, R.P., Vorhölter, F.J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.A.,

Bogdanove, A.J., and Dow, J.M. (2011). Pathogenomics of Xanthomonas: Understanding bacterium-plant interactions. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 344–355.

Sabol, P., Kulich, I., and Žárský, V. (2017). RIN4 recruits the exocyst subunit EXO70B1 to the plasma membrane. J. Exp. Bot. *68*, 3253–3265.

Saeed, B., Brillada, C., and Trujillo, M. (2019). Dissecting the plant exocyst. Curr. Opin. Plant Biol. *52*, 69–76.

Salzberg, S.L., Sommer, D.D., Schatz, M.C., Phillippy, A.M., Rabinowicz, P.D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A.L., Kelley, D., et al. (2008). Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A. BMC Genomics *9*, 1–16.

Sandstrom, A., Mitchell, P.S., Goers, L., Mu, E.W., Lesser, C.F., and Vance, R.E. (2019). Functional degradation: A mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes. Science (80-.). *364*.

Sarris, P.F., A, T.E., Skandalis, N., P, A.T., Maria, K., Michael, K., and J., P.N. (2012). Phytobacterial Type VI Secretion System - Gene Distribution, Phylogeny, Structure and Biological Functions. In Plant Pathology, p.

Sarris, P.F., Duxbury, Z., Huh, S.U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S.B., et al. (2015). A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. Cell *161*, 1089–1100.

Sarris, P.F., Cevik, V., Dagdas, G., Jones, J.D.G., and Krasileva, K. V. (2016). Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. BMC Biol. *14*.

Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., and Hirt, H. (2008). The dark side of the salad: Salmonella typhimurium overcomes the innate immune response of arabidopsis thaliana and shows an endopathogenic lifestyle. PLoS One *3*.

Schulze, S., Kay, S., Büttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Krüger, A., Lee, J., Müller, O., Scheel, D., et al. (2012). Analysis of new type III effectors from Xanthomonas uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. New Phytol. *195*, 894–911.

Sekereš, J., Pejchar, P., Šantrůček, J., Vukasinovic, N., Žárský, V., and Potocký, M. (2017). Analysis of exocyst subunit EXO70 family reveals distinct membrane polar domains in Tobacco pollen tubes. Plant Physiol. *173*, 1659–1675.

Seo, D.H., Ahn, M.Y., Park, K.Y., Kim, E.Y., and Kim, W.T. (2016). The N-terminal und motif of the arabidopsis U-box E3 ligase pub18 is critical for the negative regulation of aba-mediated stomatal movement and determines its ubiquitination specificity for exocyst subunit Exo70B1. Plant Cell 28, 2952–2973.

Shimono, M., Lu, Y.-J., Porter, K., Kvitko, B.H., Henty-Ridilla, J., Creason, A., He, S.Y., Chang, J.H., Staiger, C.J., and Day, B. (2016). The Pseudomonas syringae Type III Effector HopG1 Induces Actin Remodeling to Promote Symptom Development and Susceptibility during Infection. Plant Physiol. *171*, 2239 LP – 2255.

Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 575–581.

Sinha, D., Gupta, M.K., Patel, H.K., Ranjan, A., and Sonti, R. V (2013). Cell wall degrading enzyme induced rice innate immune responses are suppressed by the type 3 secretion system effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of Xanthomonas oryzae pv. oryzae. PLoS One 8, e75867.

Smits, T.H.M. (2019). The importance of genome sequence quality to microbial comparative genomics. BMC Genomics 20, 2–5.

Sohn, K.H., Zhang, Y., and Jones, J.D.G. (2009). The Pseudomonas syringae effector protein, AvrRPS4, requires in planta processing and the KRVY domain to function. Plant J. *57*, 1079–1091.

Song, C., and Yang, B. (2010). Mutagenesis of 18 type III effectors reveals virulence function of XopZ(PXO99) in Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Mol. Plant. Microbe. Interact. *23*, 893–902.

Soto, G.E., and Hultgren, S.J. (1999). Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. J. Bacteriol. *181*, 1059–1071.

Souza, D.P., Oka, G.U., Alvarez-Martinez, C.E., Bisson-Filho, A.W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N.S., Alegria, M.C., Barbosa, L.R.S., Salinas, R.K., et al. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. Nat. Commun. *6*, 1–9.

Spears, B.J., Howton, T.C., Gao, F., Garner, C.M., Shahid Mukhtar, M., and Gassmann, W. (2019). Direct regulation of the EFR-dependent immune response by arabidopsis TCP transcription factors. Mol. Plant-Microbe Interact. *32*, 540–549.

Stegmann, M., Anderson, R.G., Ichimura, K., Pecenkova, T., Reuter, P., Žárský, V., McDowell, J.M., Shirasu, K., and Trujillo, M. (2012). The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in Arabidopsis. Plant Cell *24*, 4703–4716.

Stegmann, M., Anderson, R.G., Westphal, L., Rosahl, S., McDowell, J.M., and Trujillo, M. (2014). The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of Arabidopsis thaliana to different pathogens and cell death. Plant Signal. Behav. *8*.

Stoddard, A., and Rolland, V. (2019). I see the light! Fluorescent proteins suitable for cell wall/apoplast targeting in Nicotiana benthamiana leaves. Plant Direct *3*.

Sukarta, O.C.A., Slootweg, E.J., and Goverse, A. (2016). Structureinformed insights for NLR functioning in plant immunity. Semin. Cell Dev. Biol. *56*, 134–149.

Synek, L., Vukašinović, N., Kulich, I., Hála, M., Aldorfová, K., Fendrych, M., and Žárský, V. (2017). EXO70C2 Is a Key Regulatory Factor for Optimal Tip Growth of Pollen. Plant Physiol. *174*, 223 LP – 240.

Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Cogez, V., Bonas, U., and Büttner, D. (2010). Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv vesicatoria. New Phytol. *187*, 983–1002.

Takken, F.L.W., and Goverse, A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. Curr. Opin. Plant Biol. *15*, 375–384.

Takken, F.L., Albrecht, M., and Tameling, W. Il (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. Curr. Opin. Plant Biol. *9*, 383–390.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony

methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731-2739.

Teh O.K. et al. (2019). Phosphorylation of the exocyst subunit Exo70B2 contributes to the regulation of its function. BioRxiv 1–28.

Teper, D., Salomon, D., Sunitha, S., Kim, J.-G., Mudgett, M.B., and Sessa, G. (2014). Xanthomonas euvesicatoria type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. Plant J. *77*, 297–309.

Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A., Liyanapathiranage, P., Iruegas-Bocardo, F., White, F.F., Goss, E.M., and Jones, J.B. (2020). Xanthomonas diversity, virulence and plant–pathogen interactions. Nat. Rev. Microbiol. *18*, 415–427.

Trantas, E.A., Sarris, P.F., Mpalantinaki, E., Papadimitriou, M., Ververidis, F., and Goumas, D.E. (2016). First Report of Xanthomonas hortorum pv. hederae Causing Bacterial Leaf Spot on Ivy in Greece. Plant Dis. *100*, 2158.

Tu, B., Hu, L., Chen, W., Li, T., Hu, B., Zheng, L., Lv, Z., You, S., Wang, Y., Ma, B., et al. (2015). Disruption of OsEXO70A1 Causes Irregular Vascular Bundles and Perturbs Mineral Nutrient Assimilation in Rice. Sci. Rep. *5*, 18609.

Vicente, J.G., and Holub, E.B. (2013). Xanthomonas campestris pv. Campestris (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops.

Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y.-D., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., et al. (2010). Endocytic and Secretory Traffic in Arabidopsis Merge in the Trans-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic

Organelle. Plant Cell 22, 1344 LP – 1357.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., and Ivanova, E.P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules *14*, 2535–2554.

Wang, F., Shang, Y., Fan, B., Yu, J.-Q., and Chen, Z. (2014). Arabidopsis LIP5, a Positive Regulator of Multivesicular Body Biogenesis, Is a Critical Target of Pathogen-Responsive MAPK Cascade in Plant Basal Defense. PLOS Pathog. *10*, e1004243.

Wang, G., Roux, B., Feng, F., Guy, E., Li, L., Li, N., Zhang, X., Lautier, M., Jardinaud, M.-F., Chabannes, M., et al. (2015). The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. Cell Host Microbe *18*, 285–295.

Wang, J., Ding, Y., Wang, J., Hillmer, S., Miao, Y., Lo, S.W., Wang, X., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2010). EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in arabidopsis and tobacco cells. Plant Cell 22, 4009–4030.

Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N., Wang, H.W., et al. (2019a). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. Science (80-.). *364*.

Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., Qi, Y., Wang, H.W., Zhou, J.M., and Chai, J. (2019b). Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. Science (80-.). *364*.

Wang, L., Rong, W., and He, C. (2008). Two Xanthomonas extracellular polygalacturonases, pghAxc and pghBxc, are regulated by type III secretion regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. Mol. Plant-Microbe Interact. *21*, 555–563.

Wang, W.-M., Liu, P.-Q., Xu, Y.-J., and Xiao, S. (2016). Protein trafficking during plant innate immunity. J. Integr. Plant Biol. *58*, 284–298.

Wang, W., Wen, Y., Berkey, R., and Xiao, S. (2009). Specific Targeting of the Arabidopsis Resistance Protein RPW8.2 to the Interfacial Membrane Encasing the Fungal Haustorium Renders Broad-Spectrum Resistance to Powdery Mildew. Plant Cell *21*, 2898 LP – 2913.

Wang, W., Liu, N., Gao, C., Rui, L., and Tang, D. (2019c). The Pseudomonas Syringae Effector AvrPtoB Associates With and Ubiquitinates Arabidopsis Exocyst Subunit EXO70B1. Front. Plant Sci. *10*, 1–16.

Wang, W., Liu, N., Gao, C., Cai, H., Romeis, T., and Tang, D. (2020). The Arabidopsis exocyst subunits EXO70B1 and EXO70B2 regulate FLS2 homeostasis at the plasma membrane. New Phytol.

Wei, H.L., Zhang, W., and Collmer, A. (2018). Modular Study of the

Type III Effector Repertoire in Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 Reveals a Matrix of Effector Interplay in Pathogenesis. Cell Rep. *23*, 1630–1638.

Williams, S.J., Sohn, K.H., Wan, L., Bernoux, M., Sarris, P.F., Segonzac, C., Ve, T., Ma, Y., Saucet, S.B., Ericsson, D.J., et al. (2014). Structural Basis for Assembly and Function of a Heterodimeric Plant Immune Receptor. Science (80-.). *344*, 299 LP – 303.

Wu, B., and Guo, W. (2015). The exocyst at a glance. J. Cell Sci. *128*, 2957–2964.

Wu, C.H., Belhaj, K., Bozkurt, T.O., Birk, M.S., and Kamoun, S. (2016). Helper NLR proteins NRC2a/b and NRC3 but not NRC1 are required for Pto-mediated cell death and resistance in Nicotiana benthamiana. New Phytol. *209*, 1344–1352.

Xing, J., Wang, T., Liu, Z., Xu, J., Yao, Y., Hu, Z., Peng, H., Xin, M., Yu, F., Zhou, D., et al. (2015). GENERAL CONTROL NONREPRESSED PROTEIN5-Mediated Histone Acetylation of FERRIC REDUCTASE DEFECTIVE3 Contributes to Iron Homeostasis in Arabidopsis. Plant Physiol. *168*, 1309 LP – 1320.

Žárský, V., Kulich, I., Fendrych, M., and Pečenková, T. (2013). Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways. Curr. Opin. Plant Biol. *16*, 726–733.

Zhai, Q., and Li, C. (2019). The plant Mediator complex and its role in jasmonate signaling. J. Exp. Bot. *70*, 3415–3424.

Zhang, C., Brown, M.Q., Van De Ven, W., Zhang, Z.M., Wu, B., Young, M.C., Synek, L., Borchardt, D., Harrison, R., Pan, S., et al. (2016). Endosidin2 targets conserved exocyst complex subunit EXO70 to inhibit exocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E41–E50.

Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., and Guo, W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. J. Cell Biol. *180*, 145–158.

Zhang, Y., Yao, Y., Qiu, X., Wang, G., Hu, Z., Chen, S., Wu, Z., Yuan, N., Gao, H., Wang, J., et al. (2019). Listeria hijacks host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing. Nat. Immunol. *20*, 433–446.

Zhao, T., Rui, L., Li, J., Nishimura, M.T., Vogel, J.P., Liu, N., Liu, S., Zhao, Y., Dangl, J.L., and Tang, D. (2015). A Truncated NLR Protein, TIR-NBS2, Is Required for Activated Defense Responses in the exo70B1 Mutant. PLoS Genet. *11*, 1–28.

Zhu, P.C., Li, Y.M., Yang, X., Zou, H.F., Zhu, X.L., Niu, X.N., Xu, L.H., Jiang, W., Huang, S., Tang, J.L., et al. (2020). Type VI secretion system is not required for virulence on rice but for inter-bacterial competition in Xanthomonas oryzae pv. oryzicola. Res. Microbiol. *171*, 64–73.

Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. Trends Immunol. *35*, 345–351.

ZUCKERKANDL, E., and PAULING, L. (1965). Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. In Evolving Genes and Proteins, V. Bryson, and H.J. Vogel, eds. (Academic Press), pp. 97–166.

Κεφάλαιο 2°

Στο 2° κεφάλαιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάζονται η εισαγωγή και τα αποτελέσματα από την ανάλυση τριών γονιδιωμάτων των βακτηριακών ειδών του γένους *Xanthomonas*. Στο τέλος του κεφαλαίου παρατίθεται η σχετική βιβλιογραφία.

Αλληλούχιση του γονιδιώματος τριών ξανθομονάδων, σημαντικών παθογόνων των φυτών.

Εισαγωγή

Η αλληλούχιση ολοένα και περισσότερων βακτηριακών γονιδιωμάτων αποτελεί σημαντικό επίτευγμα της γονιδιωματικής επιστήμης, για την κατανόηση τόσο της παθογένειας, όσο και των εξελικτικών σχέσεων των μικροοργανισμών. Επιπλέον, καθώς ολοένα και περισσότερες βακτηριακές ασθένειες έρχονται στο προσκήνιο είναι σημαντική η γνώση του γονιδιώματος των αιτιολογικών παραγόντων. Συχνά η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών για την καταπολέμηση των βακτηριακών ασθενειών οδηγεί στην αυξημένη ανθεκτικότητά των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Επομένως, η ανάλυση των μικροβιακών γονιδιωμάτων μπορεί να οδηγήσει και σε ανακάλυψη νέων στόχων των αντιβιοτικών παραγόντων (Donkor, 2013).

Ο πρώτος μικροοργανισμός, του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε πλήρως το 1995, ήταν του Gram αρνητικού βακτηρίου *Haemophilus influenza*, ένα παθογόνο του ανθρώπου (Fleischmann et al., 1995). Στη συνέχεια, ακολούθησε η αλληλούχιση μίας πληθώρας μικροβιακών γονιδιωμάτων, που προέρχονται τόσο από το βασίλειο των Βακτηρίων και των Αρχαίων (Donkor, 2013; Koonin et al., 1996). Στην ταχεία αύξηση γονιδιωματικών αλληλουχίσεων, έχει διαδραματίσει καταλυτικό ρόλο η ραγδαία αύξηση νέων τεχνολογιών αλληλούχισης και βιοπληροφορικής. Στον πίνακα 10, απεικονίζονται συγκριτικά οι διάφορες τεχνολογίες αλληλούχισης, που υπάρχουν διαθέσιμες σήμερα (Donkor, 2013). Βέβαια,

παρά τις διαθέσιμες τεχνικές που υπάρχουν, συχνά προκύπτουν διάφορα προβλήματα, όπως ο υψηλός αριθμός των contigs που προκύπτουν ή τα σφάλματα ομοπολυμερών. Αυτά είναι λάθη στον αριθμό των νουκλεοτιδίων, που προκύπτουν όταν ένα νουκλεοτίδιο επαναλαμβάνεται περισσότερο από μία φορά σε μία αλληλουχία. Επομένως, πριν από κάθε αλληλούχιση θα πρέπει να γίνεται μία ακριβής εξέταση των διαθέσιμων μεθόδων και επιλογής της πιο συμφέρουσας κατά περίπτωση (Smits, 2019).

Μέθοδος	Single- Molecule Real-Time Sequencing (Pacific Bio)	Ion Semiconductor (Ion Torrent Sequencing)	Sequencing by Synthesis (Illumina)	Chain Termination (Sanger Sequencing)
Μήκος αλληλούχισης (bp)	2900	200	50-250	400-900
Ακρίβεια	99%	98%	98%	99,9%
Αλληλουχίσεις ανά αντίδραση	35.000- 75.000	έως και 5 εκ.	έως και 3 δις.	N/A
Κόστος ανά 1Mb (US\$)	2	1	0.05-0.15	2400
Πλεονεκτήματα	Γρήγορη μέθοδος και το μεγαλύτερο μήκος αλληλούχισης	Πιο φθηνός εξοπλισμός και αρκετά γρήγορη μέθοδος	Η απόδοση της αλληλούχισης αρκετά υψηλή ανάλογα το μοντέλο του εξοπλισμού	Μεμονωμένα μεγάλη μήκη αλληλουχίσεων και ευρεία χρήση

Πίνακας 40. Συγκριτική απεικόνιση των διαφόρων μεθόδων αλληλούχισης.

Μειονεκτήματα	Όσο η	Επιρρεπής σε	Ο εξοπλισμός	Ο εξοπλισμός
	ακρίβεια	σφάλματα	είναι αρκετά	είναι ακριβός
	είναι υψηλή,	ομοπολυμερών	ακριβός	και δεν
	η απόδοση			ενδείκνυται για
	παραμένει			αλληλουχίσεις
	χαμηλή			μεγάλων
				προγραμμάτων
				(πχ.
				γονιδιώματος)

Η ξανθομονάδα, όπως αναφέραμε προηγουμένως, αποτελεί ένα ευρύ γένος Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων, το οποίο μολύνει περίπου 400 διαφορετικά μονοκότυλα και δικότυλα φυτικά είδη (Timilsina et al., 2020). Στο Κεφάλαιο 1, αναφέρθηκαν εκτενώς οι διάφοροι μηχανισμοί παθογένειας της ξανθομονάδας, καθώς επίσης και τα συμπτώματα που προκαλεί στα φυτά-ξενιστές της. Στη συνέχεια, θα μιλήσουμε συγκεκριμένα για τρία διαφορετικά είδη ξανθομονάδας, των οποίων το γονιδίωμα αλληλουχήσαμε.

Xanthomonas oryzae

Το βακτήριο του είδους Xanthomonas oryzae αποτελείται από δύο παθότυπους, oryzae (Xoo) και oryzicola (Xoc), οι οποίοι και οι δυο προσβάλλουν το μονοκότυλο είδος Oryza sativa (κν. ρύζι), αλλά με διαφορετικούς τρόπους. Το βακτήριο Xoo προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής σήψης (bacterial blight, BB), εισερχόμενο μέσω των αγγείων (ξύλωμα και φλοίωμα) του ρυζιού (Εικ. 35Α). Αντίθετα ο παθότυπος Xoc εισβάλλει στα φυτά μέσω του παρεγχυματικού ιστού τους και τους προκαλεί τη «βακτηριακή ράβδωση» (bacterial leaf streak, BLS) (Εικ. 35B). Τα βακτήρια αυτά είναι υποχρεωτικά αερόβια, μη-σπορογόνα και αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασία μεταξύ 25 και 30° C. Όπως όλες οι ξανθομονάδες, έτσι και αυτά τα είδη αναπτύσσουν χαρακτηριστικές κίτρινες αποικίες, εξαιτίας της ξανθομοναδίνης που παράγουν. Επιπλέον,

τα παθογόνα του ρυζιού παράγουν και εξωτερικούς πολυσακχαρίτες (EPS), οι οποίοι τα προστατεύουν έναντι της ξηρασίας και βοηθούν στη διασπορά τους μέσω του αέρα (Niño-Liu et al., 2006). Οι δύο παθότυποι ξεχωρίζουν μεταξύ τους σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια, όπως στην παραγωγή ακετοΐνης (Xoo-, Xoc+), στην αύξηση σε θρεπτικό μέσο που φέρει L-αλανίνη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα (Xoo-, Xoc+) και στην ανθεκτικότητα στο νιτρικό χαλκό συγκέντρωσης 0,001% (Xoo+, Xoc-) (Niño-Liu et al., 2006).

Μέχρις στιγμής, έχουν αλληλουχηθεί τρία γονιδιώματα *Xoo*: 1) το στέλεχος PXO99^A από τις Φιλιπίννες, που αποτελεί αντιπροσωπευτικό στέλεχος της φυλής 6 (Salzberg et al., 2008), 2) το στέλεχος MAFF 311018 από την Ιαπωνία, που αποτελεί αντιπροσωπευτικό στέλεχος της φυλής 1 (Ochiai et al., 2005) και 3) το στέλεχος KACC10331 από την Κορέα (Lee et al., 2005). Επιπλέον, έχει αλληλουχηθεί και το γονιδίωμα του βακτηρίου *Xoc* στελέχους BLS256 από τις Φιλιπίννες (Bogdanove et al., 2011).

Xanthomonas hortorum

Η ξανθομονάδα του είδους Χ. hortorum (Xhc) δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, όπως άλλα είδη. Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι παθότυποι τους είδους, παρόλα αυτά μόνο για τον παθότυπο carotae έχει πραγματοποιηθεί αλληλούχιση του γονιδιώματος του (Kimbrel et al., 2011). Το βακτήριο αυτό μολύνει τα φύλλα των καρότων (Daucus carota), εισερχόμενο μέσω των στομάτων ή φυσικών πληγών (Εικ. 35Γ). Κατά την εμπορική παραγωγή των σπερμάτων του φυτού, το βακτήριο αποκτά πρόσβαση και καθιερώνεται σε αυτά, εξαιτίας του ημι-άνυδρου κλίματος όπου παράγονται, με αποτέλεσμα στη συνέχεια να γίνεται δύσκολη η καταστολή της ασθένειας με τη χρήση διαφόρων βακτηριοκτόνων (Kimbrel et al., 2011). Για το λόγο αυτό, έχει αναπτυχθεί αυστηρό πρωτόκολλο ανίχνευσης του βακτηρίου στα σπέρματα καρότων πριν από τη σποροπαραγωγή, από τη Διεθνή Ομοσπονδία Σπόρων.

Από την αλληλούχιση του γονιδιώματος του βακτηρίου *Xhc* και στελέχους M081 (απόμονωση από το Όρεγκον, ΗΠΑ) αναγνωρίστηκαν αρκετά

γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για εξωκυτταρικούς παράγοντες παθογένειας συμβάλλουν στην παθογένεια που του είδους. συμπεριλαμβανομένου των gumN-gumP γονιδίων. Το σύμπλεγμα αυτό γονιδίων κωδικοποιεί για την ξανθάνη, έναν εξωπολυσακχαρίτη (EPS), που συμβάλλει στο σχηματισμό βιοφίλμ και στην παθογένεια της ξανθομονάδας. Επιπλέον, στο βακτήριο αυτό βρέθηκαν οκτώ ομόλογα γονίδια του συμπλέγματος γονιδίων rpf, που κωδικοποιούν για εξωκυτταρικά ένζυμα και πρωτεΐνες που συνθέτουν τον παράγοντα παθογένειας DSF (Diffusible factor, cis-11-methyl-2-dodecenoic acid). Ακόμη, αναγνωρίστηκε και ένα γονίδιο, ομόλογο του βακτηρίου Yersinia pestis, που κωδικοποιεί για μία αντχεσίνη, δύο γονίδια που κωδικοποιούν προϊόντα που συμβάλλουν στην έκκριση αιμολυσίνης, καθώς επίσης και ένα ομόλογο γονίδιο του P. aeruginosa που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ασπαραγίνης και Ο-αντιγόνου (Kimbrel et al., 2011). Βέβαια, αναγνωρίστηκαν και γονίδια που κωδικοποιούν για συστήματα έκκρισης τύπου IV και III, καθώς επίσης και διάφοροι τελεστές που εκκρίνονται μέσω του T3SS (Kimbrel et al., 2011).

Το παθογόνο του κισσού (Hedera helix L.), Xanthomonas hortorum παθότυπος hederae απομονώθηκε πρώτη φορά στην Ελλάδα το 2013 και συγκεκριμένα στην Ιεράπετρα της Κρήτης (Trantas & Sarris, et al., 2016). Ο παθότυπος αυτός προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης στα φύλλα του κισσού. Οι κηλίδες έχουν μεγάλη διάμετρο (περίπου 5 έως 10 mm) και όσο μεγαλώνουν γίνονται από λευκού χρώματος καφέ (Εικ. 35Ε).

Xanthomonas citri

Το βακτηριακό είδος X. citri αποτελείται από αρκετούς παθότυπους και μολύνει δικότυλα φυτά από πολλές οικογένειες (Fabaceae, Rutaceae, Malvaceae, Anacardiaceae, Lythraceae), προκαλώντας σοβαρά ζημιές σε καλλιέργειες και χαρακτηριστικά συμπτώματα των ασθενειών (An et al., 2020). Αναφορικά με την παθογένεια του συγκεκριμένου είδους, βρέθηκε ότι διαθέτει ένα εκκριτικό σύστημα τύπου IV (T4SS), με διαφοροποιημένη

λειτουργία. Συγκεκριμένα, μέσω του συστήματος αυτού μεταφέρονται τοξικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να σκοτώσουν γειτονικά βακτήρια-ανταγωνιστές του (Souza et al., 2015).

Μέχρι σήμερα, έχει αλληλουχηθεί ο παθότυπος citri, στέλεχος $A^W 12879$, το οποίο απομονώθηκε από τη Φλόριντα των ΗΠΑ και είναι παθογόνο για τα φυτικά είδη Citrus paradisi (γκρέιπφρουτ) και Citrus sinensis (πορτοκαλιά) (Εικ. 35Δ) (Jalan et al., 2013). Επιπλέον, έχουν αλληλουχηθεί και οι παθότυποι malvacearum (φυλές 18 και 20) και mangiferaeindicae (στέλεχος LMG 941), που μολύνουν τα είδη βαμβακιού και μάνγκο, αντίστοιχα (Εικ. 35Ζ, ΣΤ) (Cunnac et al., 2013; Midha et al., 2012).


Εικόνα 35. Απεικόνιση μολυσμένων φυτικών ειδών από διάφορα παθογόνα είδη και παθοτύπους της ξανθομονάδας. Α. Ο παθότυπος Χ. oryzae oryzae (Χοο) προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής σήψης στα φύλλα του ρυζιού. Β. Αντίθετα, ο παθότυπος Χ. oryzae oryzicola (Χοc) προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής ράβδωσης στα φύλλα του ρυζιού. Γ. Χαρακτηριστική προσβολή των φύλλων καρότων από τον παθότυπο carotae του είδους Χ. hortorum. Δ. Καρποί και φύλλα της πορτοκαλιάς που έχουν μολυνθεί από τον παθότυπο Χ.

citri citri. **E**. Μολυσμένα φύλλα κισσού από τον παθότυπο hederae του είδους X. hortorum. **Z**. Μολυσμένα φύλλα και καρπός βαμβακιού από τον παθότυπο malvacearum του είδους X. citri. **ΣΤ**. Μολυσμένα φύλλα και καρποί του είδους μάνγκο από το βακτήριο X. citri παθότυπος mangiferaeindicae.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής, είναι η αλληλούχιση και η ανάλυση των γονιδιωμάτων των ειδών Xanthomonas oryzae παθότυπος oryzicola στέλεχος WHRI 5234 (NCPPB 1585), Xanthomonas hortorum παθότυπος hederae στέλεχος WHRI 7744 (NCPPB 939T) και Xanthomonas citri υποείδος malvacearum στέλεχος WHRI 5232 (NCPPB 633). Τα παραπάνω είδη αποτελούν αντιπροσωπευτικά στελέχη των ειδών βακτηρίων (Type Strains) και από αυτά το Xoc συνιστάται ως επιβλαβής μικροοργανισμός καραντίνας (EPPO, 2020) Τα παθογόνα αυτά μολύνουν το ρύζι, τον κισσό και το βαμβάκι, αντίστοιχα. Το παθογόνο του ρυζιού έχει απομονωθεί από τη Μαλαισία το 1964. Αντίστοιχα, τα παθογόνα του κισσού και του βαμβακιού έχουν απομονωθεί από τις ΗΠΑ το 1943 και το Σουδάν το 1958. Ακολουθεί μία επισκόπηση των γονιδιωμάτων τους, καθώς επίσης και συγκριτική μελέτη των λειτουργικών στοιχείων που φέρουν.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Αλληλούχιση τριών ειδών του γένους Xanthomonas

Πραγματοποιήσαμε απομόνωση ολικού γενωμικού DNA και εν συνέχεια αλληλούχιση του γονιδιώματος από τρία διαφορετικά στελέχη του γένους *Xanthomonas*, που προκαλούν παθογένεια σε διαφορετικούς φυτικούς ξενιστές, των *Xanthomonas hortorum* παθότυπο *hederae*, *Xanthomonas oryzae* παθότυπο *oryzicola* και *Xanthomonas citri* υποείδους *malvacearum* (Πίν. 11). Στις εικόνες 36, 37 και 38 παρουσιάζονται διάφορα γονιδιωματικά στοιχεία που αφορούν στο γονιδίωμα του κάθε είδους και σε ποιες λειτουργικές κατηγορίες ανήκουν.

Πίνακας 11. Συγκεντρωτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων από την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων τριών ειδών ξανθομονάδων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναρτημένα στη βάση δεδομένων RAST.

	Xanthomonas		Xanthomonas		Xanthomonas	
	hortorum	pv.	oryzae	pv.	citri	subsp.
	hederae		oryzicola		malvaced	arum
Type/pathotype	WHRI	7744	WHRI	5234	WHRI	5232
strain	(NCPPB		(NCPPB 1	585)	(NCPPB	633)
	939T)					
Contigs	444		283		179	
Μέγεθος	2.353.466		1.165.726		3.924.87	9
γονιδιώματος						
(bp)						
Περιεχόμενο σε	64,5		64,3		64,9	
(G+C) (%)						
Κωδικές	2034		1085		3368	
αλληλουχίες						
RNAs	13		11		44	



Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος του βακτηρίου Xanthomonas hortorum παθότυπου hederae. Τα στοιχεία έχουν προκύψει από τη βάση δεδομένων RAST.



Εικόνα 37. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος του βακτηρίου Xanthomonas oryzae παθότυπου oryzicola. Τα στοιχεία έχουν προκύψει από τη βάση δεδομένων RAST.



Εικόνα 38. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος του βακτηρίου Xanthomonas citri υποείδους malvacearum. Τα στοιχεία έχουν προκύψει από τη βάση δεδομένων RAST.

Όσον αφορά την παθογένεια των τριών αυτών ειδών ξανθομονάδας, δε φαίνεται να διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν για τοξίνες και αντχεσίνες. Αντίθετα, μόνο το είδος *X. citri* υποείδος *malvacearum* διαθέτει τρία γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην πρωτεΐνη colicin-E2 της *E. Coli*. Συγκεκριμένα, κωδικοποιεί για τα γονίδια CreB, C και D. Επιπλέον, στο είδος αυτό βρέθηκε και ένα σύμπλεγμα 8 γονιδίων που κωδικοποιούν για την colicin-V ή την παραγωγή άλλων βακτηριοσινών.

Επιπλέον, και τα τρία αλληλουχημένα είδη κωδικοποιούν για γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά και άλλες τοξικές ενώσεις, όπως είναι τα γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα βαρέα μέταλλα και βλακταμάσες. Σύμφωνα με το RAST, δε βρέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν για εκκρινόμενες πρωτεΐνες-τελεστές. Παρόλα αυτά, το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στον κατακερματισμό τους κατά τη διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA ή στη ασυνέχεια κατά την αλληλούχιση.

Για το λόγο αυτό, αναζητήσαμε στη βάση δεδομένων NCBI, όπου έχουν δημοσιευθεί τα BioProjects (*X. hortorum* παθότυπος *hederae*: PRJNA438828, *X. oryzae* παθότυπος *oryzicola*: PRJNA438823 και *X. citri*

υποείδος malvacearum: PRJNA438827) για κάθε ένα είδος ξεχωριστά τους διάφορους τελεστές, που εκκρίνονται από το σύστημα έκκρισης τύπου ΙΙΙ. Στον πίνακα 12 απεικονίζονται οι τελεστές που βρέθηκαν, καθώς επίσης και ο κωδικός τους (Locus number) στη βάση δεδομένων NCBI.

Πίνακας 12. Απεικόνιση των τελεστών, που εκκρίνονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ, μαζί με τον κωδικό τους αριθμό (Locus number) από τη βάση δεδομένων NCBI. Όπου δε βρέθηκε ο συγκεκριμένος τελεστής, που αναγράφεται στην πρώτη στήλη, σημειώνεται με (-).

Τελεστές	Xanthomonas	Xanthomonas	X. citri	
	oryzae	hortorum	υποείδος	
	παθότυπος	παθότυπος	malvacearum	
	oryzicola	hederae	WHRI 5232	
	στέλεχος	στέλεχος		
	WHRI 5234	WHRI 7744		
XopP	PUE94453,	PUF01891	PUE89439	
	PUE94452			
ХорК	PUE98628	PUF01285	PUE96375	
XopI	PUE97529	-	-	
XopR	PUE95911	PUF00955	PUE93663	
XopAK	PUE97749	-	-	
HrpB7	PUE94078	PUF01871	PUE96571	
HrpB4	PUE94075	PUF01874	PUE96574	
HrpB2	PUE94073	PUF01876	PUE96576	
HpaP	PUE94069	-	PUE96579	
XopAD	PUE91612	-	-	
XopQ	PUE92340	PUF00340	PUE91213	
AvrBs3	partially	partially	partially	
	sequenced,	sequenced,	sequenced,	
	fragmented in	fragmented in	fragmented in	
	many locus	many locus	many locus	
	numbers	numbers	numbers	
SctP	-	PUF01902	-	
HopG1	-	PUF01807,	PUE91815	
		PUE93156		

ХорХ	PUE93731	PUF01817	PUE91720
XopN	PUE93152	PUF00904	-
Type-III	PUE91837	PUE99366	PUE90560
pantothenate			
kinase			
XopB	-	PUE99497	-
AvrXccC	-	PUE93971,	-
		PUE92203	
AvrBs1	-	PUE92420	-
AvrXccA1	-	-	PUE91172
XopC	-	-	PUE89478
XopE3	-	-	PUE89356
XopE2	-	-	PUE89268,
			PUE93671
AvrBs2	-	-	PUE93017
HopAF1	-	-	PUE89834

Εκτός από τους T3EPs, βρέθηκαν και στα τρία αλληλουχημένα είδη πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από συντηρημένα γονίδια της συσκευής έκκρισης τύπου ΙΙΙ, όπως η πρωτεΐνη «δαχτυλίδι» της εξωτερικής και οικογένειας εσωτερικής μεμβράνης της EscC/YscC/HrcC και EscJ/YscJ/HrcJ, αντίστοιχα. Επίσης βρέθηκαν η αντλία ATP (ATPase) της οικογένειας EscN/YscN/HrcN, οι πρωτεΐνες HrpE/YscL, HrpB1, YscQ/HrcQ, καθώς επίσης και πρωτεΐνες εξόδου των οικογενειών EscV/YscV/HrcV EscR/YscR/HrcR, EscU/YscU/HrcU, και EscS/YscS/HrcS. Τέλος, εκτός από το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ, βρέθηκαν και στα τρία αλληλουχημένα είδη, πρωτεΐνες των εκκριτικών συστημάτων τύπου Ι, ΙΙ, ΙV και VΙ και πρωτεΐνες που εκκρίνονται από αυτά.

Υλικά και Μέθοδοι

Βακτηριακά είδη και στελέχη

Xanthomonas

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε τα είδη Χ. oryzae παθότυπος oryzicola στελέχους WHRI 5234 (NCPPB 1585), Xanthomonas hortorum παθότυπος hederae στελέχους WHRI 7744 (NCPPB 939T) και Xanthomonas citri υποείδος malvacearum στελέχους WHRI 5232 (NCPPB 633). Τα είδη αυτά αναπτύχθηκαν σε στέρεη θρεπτική καλλιέργεια NA broth, σύστασης 0,6% πεπτόνης A, 0,1% εκχύλισμα από βοοειδή, 0,2% εκχύλισμα ζύμης, 0,5% χλωριούχου νατρίου και 1,5% άγαρ, pH 7.3, με αερισμό στους 28 °C, χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού, για έως και 4 ημέρες. Στη συνέχεια, αφού διαπιστώθηκε η ύπαρξη αμιγούς καλλιέργειας, προχωρήσαμε σε υγρή καλλιέργεια.

Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την αλληλούχιση των τριών αυτών ειδών, απομονώσαμε το γενωμικό τους DNA, με τη χρήση της μεθόδου CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Minas et al., 2011). Η επαναδιάλυση των gDNAs έγινε με διάλυμα TE (10 mM TRIS και 0.1 mM EDTA, pH 8.0), σύμφωνα με τις προδιαγραφές της πλατφόρμας αλληλούχισης (http://biosciences.exeter.ac.uk/sequencing/experiment/samples/illumina/).

Αλληλούχιση των βακτηριακών γονιδιωμάτων

Η αλληλούχιση των τριών βακτηριακών γονιδιωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πλατφόρμας αλληλούχισης Illumina MiSeq επόμενης γενιάς, από το Κέντρο Αλληλούχισης του Πανεπιστημίου του Exeter (http://sequencing.exeter.ac.uk). Δημιουργήθηκαν 2,6 εκατομμύρια, 1,5 εκκατομύρια και 1,6 εκατομμύρια ζεύγη αλληλουχίσεων μήκους 300 νουκλεοτιδίων για τα είδη Xhh, Xoc και Xcm, αντίστοιχα. Τα άκρα των αλληλουχιών κόπηκαν με το TrimGalore (https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore) και συναρμολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPAdes version 3.11.1 (Bankevich et al., 2012).

Βιβλιογραφία

An, S.Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.J., He, Y.Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., et al. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. FEMS Microbiol. Rev. *44*, 1–32.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. *19*, 455–477.

Bogdanove, A.J., Koebnik, R., Lu, H., Furutani, A., Angiuoli, S. V., Patil, P.B., Van Sluys, M.A., Ryan, R.P., Meyer, D.F., Han, S.W., et al. (2011). Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic Xanthomonas spp. J. Bacteriol. *193*, 5450–5464.

Cunnac, S., Bolot, S., Serna, N.F., Ortiz, E., Szurek, B., Noël, L.D., Arlat, M., Jacques, M.A., Gagnevin, L., Carrere, S., et al. (2013). High-quality draft genome sequences of two Xanthomonas citri pv. malvacearum strains. Genome Announc. *1*, 4–5.

Donkor, E.S. (2013). Sequencing of bacterial genomes: Principles and insights into pathogenesis and development of antibiotics. Genes (Basel). *4*, 556–572.

EPPO (2020). eppo A1 and A2 pests for recommendation as quarantine pests. p.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science (80-.). *269*, 496–512.

Jalan, N., Kumar, D., Yu, F., Jones, J.B., Graham, J.H., and Wang, N. (2013). Complete genome sequence of Xanthomonas citri subsp. citri strain AW12879, a restricted-host-range citrus canker-causing bacterium. Genome Announc. *1*, 4–5.

Kimbrel, J.A., Givan, S.A., Temple, T.N., Johnson, K.B., and Chang, J.H. (2011). Genome sequencing and comparative analysis of the carrot bacterial blight pathogen, Xanthomonas hortorum pv. carotae M081, for insights into pathogenicity and applications in molecular diagnostics.

Mol. Plant Pathol. 12, 580-594.

Koonin, E. V., Mushegian, A.R., and Rudd, K.E. (1996). Sequencing and analysis of bacterial genomes. Curr. Biol. *6*, 404–416.

Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., et al. (2005). The genome sequence of Xanthomonas oryzae pathovar oryzae KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Res. *33*, 577–586.

Midha, S., Ranjan, M., Sharma, V., Pinnaka, A.K., and Patil, P.B. (2012). Genome sequence of xanthomonas citri pv. Mangiferaeindicae strain LMG 941. J. Bacteriol. *194*, 3031.

Minas, K., McEwan, N.R., Newbold, C.J., and Scott, K.P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. FEMS Microbiol. Lett. *325*, 162–169.

Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C., and Bogdanove, A.J. (2006). Xanthomonas oryzae pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. *7*, 303–324.

Ochiai, H., Inoue, Y., Takeya, M., Sasaki, A., and Kaku, H. (2005). Genome Sequence of Xanthomonas oryzae pv. oryzae Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity. Japan Agric. Res. Q. JARQ *39*, 275– 287.

Salzberg, S.L., Sommer, D.D., Schatz, M.C., Phillippy, A.M., Rabinowicz, P.D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A.L., Kelley, D., et al. (2008). Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A. BMC Genomics *9*, 1–16.

Smits, T.H.M. (2019). The importance of genome sequence quality to microbial comparative genomics. BMC Genomics 20, 2–5.

Souza, D.P., Oka, G.U., Alvarez-Martinez, C.E., Bisson-Filho, A.W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N.S., Alegria, M.C., Barbosa, L.R.S., Salinas, R.K., et al. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. Nat. Commun. *6*, 1–9.

Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A., Liyanapathiranage, P., Iruegas-

Bocardo, F., White, F.F., Goss, E.M., and Jones, J.B. (2020). Xanthomonas diversity, virulence and plant–pathogen interactions. Nat. Rev. Microbiol. *18*, 415–427.

Trantas, E.A., Sarris, P.F., Mpalantinaki, E., Papadimitriou, M., Ververidis, F., and Goumas, D.E. (2016). First Report of Xanthomonas hortorum pv. hederae Causing Bacterial Leaf Spot on Ivy in Greece. Plant Dis. *100*, 2158. Abramovitch, R.B., and Martin, G.B. (2005). AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. FEMS Microbiol. Lett. *245*, 1–8.

Acheampong, A.K., Shanks, C., Cheng, C.-Y., Schaller, G.E., Dagdas, Y., and Kieber, J.J. (2020). EXO70D isoforms mediate selective autophagic degradation of type-A ARR proteins to regulate cytokinin sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. *117*, 27034 LP – 27043.

Afzal, A.J., da Cunha, L., and Mackey, D. (2011). Separable Fragments and Membrane Tethering of Arabidopsis RIN4 Regulate Its Suppression of PAMP-Triggered Immunity. Plant Cell 23, 3798 LP – 3811.

Ahmed, S.M., Nishida-Fukuda, H., Li, Y., McDonald, W.H., Gradinaru, C.C., and Macara, I.G. (2018). Exocyst dynamics during vesicle tethering and fusion. Nat. Commun. *9*.

Akimoto-Tomiyama, C., Furutani, A., Tsuge, S., Washington, E.J., Nishizawa, Y., Minami, E., and Ochiai, H. (2012). XopR, a type III effector secreted by Xanthomonas oryzae pv. oryzae, suppresses microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in Arabidopsis thaliana. Mol. Plant. Microbe. Interact. 25, 505–514.

An, Q., Ehlers, K., Kogel, K.-H., Van Bel, A.J.E., and Hückelhoven, R. (2006a). Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. New Phytol. *172*, 563–576.

An, Q., Hückelhoven, R., Kogel, K.H., and van Bel, A.J.E. (2006b). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. Cell. Microbiol. *8*, 1009–1019.

An, Q., van Bel, A.J.E., and Hückelhoven, R. (2007). Do Plant Cells Secrete Exosomes Derived from Multivesicular Bodies? Qianli. Plant Signal. Behav. 2, 4–7.

An, S.Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.J., He, Y.Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., et al. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. FEMS Microbiol. Rev. 44, 1–32.

Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1997). A mRNA Signal for the

Type III Secretion of Yop Proteins by Yersinia enterocolitica. Science (80-.). 278, 1140 LP – 1143.

Arbeloa, A., Oates, C. V., Marchès, O., Hartland, E.L., and Frankel, G. (2011). Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli type III secretion effector EspV induces radical morphological changes in eukaryotic cells. Infect. Immun. *79*, 1067–1076.

Asaoka, R., Uemura, T., Ito, J., Fujimoto, M., Ito, E., Ueda, T., and Nakano, A. (2013). Arabidopsis RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. Plant J. *73*, 240–249.

Barragan, A.C., and Weigel, D. Plant NLR Diversity : The Known Unknowns of Pan-NLRomes A Brief History of Plant NLRs.

Beuder, S., Dorchak, A., Bhide, A., Moeller, S.R., Petersen, B.L., and MacAlister, C.A. (2020). Exocyst mutants suppress pollen tube growth and cell wall structural defects of hydroxyproline O-arabinosyltransferase mutants. Plant J. *103*, 1399–1419.

van der Biezen, E.A., and Jones, J.D. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. Curr. Biol. *8*, R226-7.

Bigeard, J., Colcombet, J., and Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). Mol. Plant 8, 521–539.

Block, A., Guo, M., Li, G., Elowsky, C., Clemente, T.E., and Alfano, J.R. (2010). The Pseudomonas syringae type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. Cell. Microbiol. *12*, 318–330.

Bozkurt, T.O., Belhaj, K., Dagdas, Y.F., Chaparro-garcia, A., Wu, C., Cano, L.M., and Kamoun, S. (2015). Rerouting of Plant Late Endocytic Trafficking Toward a Pathogen Interface. Traffic.

Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Caplan, J.L., Tsao, J., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S.P. (2007). A Novel Role for the TIR Domain in Association with Pathogen-Derived Elicitors. PLOS Biol. *5*, e68.

Büttner, D., and Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. Curr. Opin. Plant Biol. *6*, 312–319.

Büttner, D., and Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of

Xanthomonas virulence factors. FEMS Microbiol. Rev. 34, 107-133.

Castañeda, A., Reddy, J.D., El-Yacoubi, B., and Gabriel, D.W. (2005). Mutagenesis of all eight avr genes in Xanthomonas campestris pv. campestris had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. Mol. Plant. Microbe. Interact. *18*, 1306–1317.

Cenens, W., Andrade, M.O., Llontop, E., Alvarez-Martinez, C.E., Sgro, G.G., and Farah, C.S. (2020). Bactericidal type IV secretion system homeostasis in Xanthomonas citri. PLoS Pathog. *16*, 1–24.

Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., et al. (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the Magnaporthe oryzae effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. Plant Cell *25*, 1463–1481.

Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., and Dodds, P.N. (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: The "integrated decoy" hypothesis. Front. Plant Sci. *5*, 1–10.

Chen, Y., Liu, Z., and Halterman, D.A. (2012). Molecular Determinants of Resistance Activation and Suppression by Phytophthora infestans Effector IPI-O. PLOS Pathog. *8*, e1002595.

Chi, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Fan, B., Yu, J.Q., and Chen, Z. (2013). Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. Mol. Plant *6*, 287–300.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1999). Floral dip : a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *16*, 735–743.

Contento, A.L., and Bassham, D.C. (2012). Structure and function of endosomes in plant cells. J. Cell Sci. *125*, 3511 LP – 3518.

Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gramnegative bacteria: Structural and mechanistic insights. Nat. Rev. Microbiol. *13*, 343–359.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284, 1318–1322.

Cui, Y., He, Y., Cao, W., Gao, J., and Jiang, L. (2018). The multivesicular body and autophagosome pathways in plants. Front. Plant Sci. *871*, 1–10.

Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2019). A pentangular plant inflammasome. Science (80-.). *364*, 31–32.

Das, A., Rangaraj, N., and Sonti, R. V (2009). Multiple adhesin-like functions of Xanthomonas oryzae pv. oryzae are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. Mol. Plant. Microbe. Interact. 22, 73–85.

Daskalov, A., Habenstein, B., Martinez, D., Debets, A.J.M., Sabaté, R., Loquet, A., and Saupe, S.J. (2015). Signal Transduction by a Fungal NOD-Like Receptor Based on Propagation of a Prion Amyloid Fold. PLOS Biol. *13*, e1002059.

Dean, P. (2011). Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. FEMS Microbiol. Rev. *35*, 1100–1125.

Deb, S., Gupta, M.K., Patel, H.K., and Sonti, R. V (2019). Xanthomonas oryzae pv. oryzae XopQ protein suppresses rice immune responses through interaction with two 14-3-3 proteins but its phospho-null mutant induces rice immune responses and interacts with another 14-3-3 protein. Mol. Plant Pathol. 20, 976–989.

Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y.-D., and Schumacher, K. (2006). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in Arabidopsis Plant Cell *18*, 715 LP – 730.

Ding, Y., Wang, J., Lai, J.H.C., Chan, V.H.L., Wang, X., Cai, Y., Tan, X., Bao, Y., Xia, J., Robinson, D.G., et al. (2014). Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals. Mol. Biol. Cell *25*, 412–426.

Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plantĝ€" pathogen interactions. Nat. Rev. Genet. 11, 539–548.

Donnenberg, M.S. (2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature 406, 768–774.

Dow, J.M., Scofield, G., Trafford, K., Turner, P.C., and Daniels, M.J. (1987). A gene cluster in Xanthomonas campestris pv. campestris required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. Physiol. Mol. Plant Pathol. *31*, 261–271.

Du, Y., Mpina, M.H., Birch, P.R.J., Bouwmeester, K., and Govers, F. (2015). Phytophthora infestans RXLR effector AVR1 interacts with exocyst component Sec5 to manipulate plant immunity. Plant Physiol. *169*, 1975–1990.

Dubrow, Z., Sunitha, S., Kim, J.G., Aakre, C.D., Girija, A.M., Sobol, G., Teper, D., Chen, Y.C., Ozbaki-Yagan, N., Vance, H., et al. (2018). Tomato 14-3-3 proteins are required for Xv3 disease resistance and interact with a subset of xanthomonas euvesicatoria effectors. Mol. Plant-Microbe Interact. *31*, 1301–1311.

Duxbury, Z., Ma, Y., Furzer, O.J., Huh, S.U., Cevik, V., Jones, J.D.G., and Sarris, P.F. (2016). Pathogen perception by NLRs in plants and animals: Parallel worlds. BioEssays *38*, 769–781.

Elias, M., Drdova, E., Ziak, D., Bavlnka, B., Hala, M., Cvrckova, F., Soukupova, H., and Zarsky, V. (2003). The exocyst complex in plants. Cell Biol. Int. 27, 199–201.

Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. PLoS One *3*.

F, Sarris, P., A, T.E., Skandalis, N., P, A.T., Maria, K., Michael, K., and J., P.N. (2012). Phytobacterial Type VI Secretion System - Gene Distribution, Phylogeny, Structure and Biological Functions. In Plant Pathology, p.

Fang, Y., Lin, H., Wu, L., Ren, D., Ye, W., Dong, G., Zhu, L., and Guo, L. (2015). Genome sequence of Xanthomonas sacchari R1, a biocontrol bacterium isolated from the rice seed. J. Biotechnol. *206*, 77–78.

Fenyk, S., Townsend, P., Dixon, C., Spies, G., Campillo, A., Slootweg, E., Westerhof, L., Gawehns, F., Knight, M., Sharples, G., et al. (2015). The Potato Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat (NLR) Immune Receptor Rx1 Is a Pathogen-dependent DNA-deforming Protein. J. Biol. Chem. 290.

Février, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. Curr. Opin. Cell Biol. *16*, 415–

421.

Fujisaki, K., Abe, Y., Ito, A., Saitoh, H., Yoshida, K., Kanzaki, H., Kanzaki, E., Utsushi, H., Yamashita, T., Kamoun, S., et al. (2015). Rice Exo70 interacts with a fungal effector, AVR-Pii, and is required for AVR-Pii-triggered immunity. Plant J. *83*, 875–887.

Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., and Dangl, J.L. (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. Science *269*, 843–846.

Green, E.R., and Mecsas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. Microbiol. Spectr. *4*, 1–32.

Gu, Y., and Innes, R.W. (2012). The KEEP on going protein of arabidopsis regulates intracellular protein trafficking and is degraded during fungal infectionC W OA. Plant Cell *24*, 4717–4730.

Gu, Y., Zavaliev, R., and Dong, X. (2017). Membrane Trafficking in Plant Immunity. Mol. Plant *10*, 1026–1034.

Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. EMBO J. *18*, 1071–1080.

Habyarimana, F., and Ahmer, B.M.M. (2013). More evidence for secretion signals within the mRNA of type 3 secreted effectors. J. Bacteriol. *195*, 2117–2118.

Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J.E., et al. (2008). An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. Plant Cell *20*, 1330–1345.

Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K., and Jones, J.D.G. (1994). Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene Avr9 in tomato seedlings carrying the disease-resistance gene Cf-9. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 10445–10449.

Haney, C.H., Urbach, J.M., and Ausubel, F.M. (2014). Differences and similarities: Innate immunity in plants and animals. Biochem. (Lond). *36*, 40–44.

He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J., and Guo, W. (2007). Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the

plasma membrane. EMBO J. 26, 4053–4065.

Heider, M.R., Gu, M., Duffy, C.M., Mirza, A.M., Marcotte, L.L., Walls, A.C., Farrall, N., Hakhverdyan, Z., Field, M.C., Rout, M.P., et al. (2016). Subunit connectivity, assembly determinants and architecture of the yeast exocyst complex. Nat. Struct. Mol. Biol. *23*, 59–66.

Hong, W., and Lev, S. (2014). Tethering the assembly of SNARE complexes. Trends Cell Biol. *24*, 35–43.

van der Hoorn, R.A.L., and Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. Plant Cell *20*, 2009 LP – 2017.

Horvath, A., Horvath, A., Riezman, H., and Riezman, H. (1994). Rapid Protein Extraction from. Yeast *1*, 1305–1310.

Huang, Y., Li, T., Xu, T., Tang, Z., Guo, J., and Cai, Y. (2020). Multiple Xanthomonas campestris pv. campestris 8004 type III effectors inhibit immunity induced by flg22. Planta 252, 88.

Hueck, C.J. (1998). Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *62*, 379–433.

Ignatov, A.N., Monakhos, G.F., Djalilov, F.S., and Pozmogova, G. V (2002). Avirulence Gene from Xanthomonas campestris pv. campestris Homologous to the avrBs2 Locus is Recognized in Race-Specific Reaction by Two Different Resistance Genes in Brassicas. Russ. J. Genet. *38*, 1404–1410.

Ishikawa, K., Yamaguchi, K., Sakamoto, K., Yoshimura, S., Inoue, K., Tsuge, S., Kojima, C., and Kawasaki, T. (2014). Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. Nat. Commun. *5*, 1–11.

Jacobs, J.M., Pesce, C., Lefeuvre, P., and Koebnik, R. (2015). Comparative genomics of a cannabis pathogen reveals insight into the evolution of pathogenicity in xanthomonas. Front. Plant Sci. *6*, 1–13.

Jeannette L., Tenthorey, Eric M. Kofoed, Matthew D. Daugherty, Harmit S. Malik, and R.E.V. (2014). Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes. Mol. Cell *54*, 17–29.

Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L., and

Greenberg, J.T. (2007). A J domain virulence effector of Pseudomonas syringae remodels host chloroplasts and suppresses defenses. Curr. Biol. *17*, 499–508.

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J. *19*, 4004–4014.

Jiang, B.-L., He, Y.-Q., Cen, W.-J., Wei, H.-Y., Jiang, G.-F., Jiang, W., Hang, X.-H., Feng, J.-X., Lu, G.-T., Tang, D.-J., et al. (2008). The type III secretion effector XopXccN of Xanthomonas campestris pv. campestris is required for full virulence. Res. Microbiol. *159*, 216–220.

Jiang, W., Jiang, B. Le, Xu, R.Q., Huang, J.D., Wei, H.Y., Jiang, G.F., Cen, W.J., Liu, J., Ge, Y.Y., Li, G.H., et al. (2009). Identification of six type III effector genes with the pip box in xanthomonas campestris pv. campestris and five of them contribute individually to full pathogenicity. Mol. Plant-Microbe Interact. *22*, 1401–1411.

Jin, M.S., and Lee, J.-O. (2008). Structures of TLR-ligand complexes. Curr. Opin. Immunol. *20*, 414–419.

Jo, S.H., Lee, J., Park, E., Kim, D.W., Lee, D.H., Ryu, C.M., Choi, D., and Park, J.M. (2019). A human pathogenic bacterium Shigella proliferates in plants through adoption of type III effectors for shigellosis. Plant Cell Environ. *42*, 2962–2978.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature 444, 323–329.

Kalmbach, L., Hématy, K., De Bellis, D., Barberon, M., Fujita, S., Ursache, R., Daraspe, J., and Geldner, N. (2017). Transient cell-specific EXO70A1 activity in the CASP domain and Casparian strip localization. Nat. Plants *3*, 1–9.

Kamal Kumar Malukani, Ashish Ranjan, Hota Shiva Jyothi, Hitendra K. Patel, R.V.S. (2019). The dual function receptor kinase, OsWAKL21.2, is involved in elaboration of lipaseA/esterase induced immune responses in ri. BioRxiv.

Kapos, P., Devendrakumar, K.T., and Li, X. (2019). Plant NLRs: From discovery to application. Plant Sci. 279, 3–18.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.

(2016). Trabajo práctico Nº 13 . Varianzas en función de variable independiente categórica. Nat. Protoc. *10*, 845–858.

Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2018). Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. Plant J. *93*, 651–663.

Kim, H., O'Connell, R., Maekawa-Yoshikawa, M., Uemura, T., Neumann, U., and Schulze-Lefert, P. (2014). The powdery mildew resistance protein RPW8.2 is carried on VAMP721/722 vesicles to the extrahaustorial membrane of haustorial complexes. Plant J. *79*, 835–847.

Kim, J.-G., Li, X., Roden, J.A., Taylor, K.W., Aakre, C.D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., et al. (2009). Xanthomonas T3S Effector XopN Suppresses PAMP-Triggered Immunity and Interacts with a Tomato Atypical Receptor-Like Kinase and TFT1. Plant Cell *21*, 1305–1323.

Koonin, E. V, and Aravind, L. (2000). The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. Trends Biochem. Sci. 25, 223–224.

Kulich, I., Pečenková, T., Sekereš, J., Smetana, O., Fendrych, M., Foissner, I., Höftberger, M., and Žárský, V. (2013). Arabidopsis Exocyst Subcomplex Containing Subunit EXO70B1 Is Involved in Autophagy-Related Transport to the Vacuole. Traffic *14*, 1155–1165.

Kulich, I., Vojtíková, Z., Glanc, M., Ortmannová, J., Rasmann, S., and Žárský, V. (2015). Cell Wall Maturation of Arabidopsis Trichomes Is Dependent on Exocyst Subunit EXO70H4 and Involves Callose Deposition. Plant Physiol. *168*, 120 LP – 131.

Kulich, I., Vojtíková, Z., Sabol, P., Ortmannová, J., Neděla, V., Tihlaříková, E., and Zárský, V. (2018). Exocyst subunit EXO70H4 has a specific role in callose synthase secretion and silica accumulation. Plant Physiol. *176*, 2040–2051.

Leipe, D.D., Koonin, E. V, and Aravind, L. (2004). STAND, a Class of P-Loop NTPases Including Animal and Plant Regulators of Programmed Cell Death: Multiple, Complex Domain Architectures, Unusual Phyletic Patterns, and Evolution by Horizontal Gene Transfer. J. Mol. Biol. *343*, 1–28.

Li, D., Xu, X., Hu, X., Liu, Q., Wang, Z., Zhang, H., Wang, H., Wei, M.,

Wang, H., Liu, H., et al. (2015a). Genome-wide analysis and heavy metal-induced expression profiling of the HMA gene family in populus trichocarpa. Front. Plant Sci. 6, 1–15.

Li, S., van Os, G.M.A., Ren, S., Yu, D., Ketelaar, T., Emons, A.M.C., and Liu, C.M. (2010). Expression and functional analyses of EXO70 genes in arabidopsis implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis. Plant Physiol. *154*, 1819–1830.

Li, S., Chen, M., Yu, D., Ren, S., Sun, S., Liu, L., Ketelaar, T., Emons, A.-M.C., and Liu, C.-M. (2013). EXO70A1-mediated vesicle trafficking is critical for tracheary element development in Arabidopsis. Plant Cell *25*, 1774–1786.

Li, S., Wang, Y., Wang, S., Fang, A., Wang, J., Liu, L., Zhang, K., Mao, Y., and Sun, W. (2015b). The Type III Effector AvrBs2 in Xanthomonas oryzae pv. oryzicola Suppresses Rice Immunity and Promotes Disease Development. Mol. Plant. Microbe. Interact. *28*, 869–880.

Liao, Z.-X., Li, J.-Y., Mo, X.-Y., Ni, Z., Jiang, W., He, Y.-Q., and Huang, S. (2020). Type III effectors xopN and avrBS2 contribute to the virulence of Xanthomonas oryzae pv. oryzicola strain GX01. Res. Microbiol. *171*, 102–106.

Lin Jin, D.M.M. (2017). Measuring Callose Deposition, an Indicator of Cell Wall Reinforcement, During Bacterial Infection in Arabidopsis. Methods Mol. Biol. *1578*, 195–205.

Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M.A., White, F.F., Ryan, R.P., Dow, J.M., Rabinowicz, P., Salzberg, S.L., Leach, J.E., Sonti, R., et al. (2008). Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in Xanthomonas. PLoS One *3*.

Lu, Y., Hatsugai, N., Katagiri, F., Ishimaru, C.A., and Glazebrook, J. (2015). Putative serine protease effectors of clavibacter michiganensis induce a hypersensitive response in the apoplast of nicotiana species. Mol. Plant-Microbe Interact. *28*, 1216–1226.

Mackey, D., Holt III, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L. (2002). RIN4 Interacts with Pseudomonas syringae Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis. Cell *108*, 743–754. Majander, K., Anton, L., Antikainen, J., Lång, H., Brummer, M., Korhonen, T.K., and Westerlund-Wikström, B. (2005). Extracellular secretion of polypeptides using a modified Escherichia coli flagellar secretion apparatus. Nat. Biotechnol. 23, 475–481.

Marković, V., Cvrčková, F., Potocký, M., Pejchar, P., Kollárová, E., Kulich, I., Synek, L., and Žárský, V. (2019). EXO70A2 is critical for the exocyst complex function in Arabidopsis pollen. BioRxiv 831875.

Martin-Urdiroz, M., Deeks, M.J., Horton, C.G., Dawe, H.R., and Jourdain, I. (2016). The exocyst complex in health and disease. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 1–22.

Mathur, S., Vyas, S., Kapoor, S., and Tyagi, A.K. (2011). The mediator complex in plants: Structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (Arabidopsis) and a monocot (Rice) during reproduction and abiotic stress. Plant Physiol. *157*, 1609–1627.

Medina, C.A., Reyes, P.A., Trujillo, C.A., Gonzalez, J.L., Bejarano, D.A., Montenegro, N.A., Jacobs, J.M., Joe, A., Restrepo, S., Alfano, J.R., et al. (2018). The role of type III effectors from Xanthomonas axonopodis pv. manihotis in virulence and suppression of plant immunity. Mol. Plant Pathol. *19*, 593–606.

Mei, K., Li, Y., Wang, S., Shao, G., Wang, J., Ding, Y., Luo, G., Yue, P., Liu, J.J., Wang, X., et al. (2018). Cryo-EM structure of the exocyst complex. Nat. Struct. Mol. Biol. 25, 139–146.

Mermigka, G., and Sarris, P.F. (2019). The Rise of Plant Resistosomes. Trends Immunol. *40*, 670–673.

Mermigka, G., Amprazi, M., Mentzelopoulou, A., Amartolou, A., and Sarris, P.F. (2020). Plant and Animal Innate Immunity Complexes: Fighting Different Enemies with Similar Weapons. Trends Plant Sci. 25, 80–91.

Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., and Young, N.D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J. *20*, 317–332.

Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W. (2003). Genome-Wide Analysis of NBS-LRR–Encoding Genes in Arabidopsis. Plant Cell *15*, 809 LP – 834.

Michalopoulou, V.A., Vicente, J.G., Studholme, D.J., and Sarris, P.F. (2018). Draft Genome Sequences of Pathotype Strains for Three Pathovars Belonging to Three Xanthomonas Species . Microbiol. Resour. Announc. 7, 4–5.

Michalopoulou, V.A., Kotsaridis, K., and Mermigka, G. (2020). The host exocyst complex is targeted by a conserved bacterial type III effector protein that promotes virulence. BioRxiv 1–32.

Mukhtar, M.S., Carvunis, A., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M.T., et al. (2011). Plant Immune System Network. Science (80-.). *333*, 596–601.

Nishida-Fukuda, H. (2019). The Exocyst: Dynamic Machine or Static Tethering Complex? BioEssays *41*, 1–5.

Oblessuc, P.R., Matiolli, C.C., and Melotto, M. (2020). Novel molecular components involved in callose-mediated Arabidopsis defense against Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7. BMC Plant Biol. *20*, 16.

Ogura, T., Goeschl, C., Filiault, D., Mirea, M., Slovak, R., Wolhrab, B., Satbhai, S.B., and Busch, W. (2019). Root System Depth in Arabidopsis Is Shaped by EXOCYST70A3 via the Dynamic Modulation of Auxin Transport. Cell *178*, 400-412.e16.

Okuyama, Y., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida, K., Tamiru, M., Saitoh, H., Fujibe, T., Matsumura, H., Shenton, M., Galam, D.C., et al. (2011). A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. Plant J. *66*, 467–479.

Ostertag, M., Stammler, J., Douchkov, D., Eichmann, R., and Hückelhoven, R. (2013). The conserved oligomeric Golgi complex is involved in penetration resistance of barley to the barley powdery mildew fungus. Mol. Plant Pathol. *14*, 230–240.

Palmer, T., Finney, A.J., Saha, C.K., Atkinson, G.C., and Sargent, F. (2020). A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. Mol. Microbiol. 1–11.

Pan, Q., Wendel, J., and Fluhr, R. (2000). Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. J. Mol. Evol. *50*, 203–213.

Pečenková, T., Marković, V., Sabol, P., Kulich, I., and Zárský, V. (2017). Exocyst and autophagy-related membrane trafficking in plants. J. Exp. Bot. *69*, 47–57.

Pečenková, T., Potocká, A., Potocký, M., Ortmannová, J., Drs, M., Janková Drdová, E., Pejchar, P., Synek, L., Soukupová, H., Žárský, V., et al. (2020). Redundant and Diversified Roles Among Selected Arabidopsis thaliana EXO70 Paralogs During Biotic Stress Responses. Front. Plant Sci. 11, 1–14.

Peenková, T., Hála, M., Kulich, I., Kocourková, D., Drdová, E., Fendrych, M., Toupalová, H., and Žárský, V. (2011). The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. J. Exp. Bot. *62*, 2107–2116.

Picco, A., Irastorza-Azcarate, I., Specht, T., Böke, D., Pazos, I., Rivier-Cordey, A.S., Devos, D.P., Kaksonen, M., and Gallego, O. (2017). The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis for Exocytosis. Cell *168*, 400-412.e18.

Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A., et al. (2009). The complete genome sequence of Xanthomonas albilineans provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. BMC Genomics *10*, 616.

Popov, G., Fraiture, M., Brunner, F., and Sessa, G. (2016). Multiple xanthomonas euvesicatoria type III Effectors Inhibit flg22-Triggered immunity. Mol. Plant-Microbe Interact. *29*, 651–660.

Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M.T., et al. (2011). Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. BMC Genomics *12*.

Qin, J., Zhou, X., Sun, L., Wang, K., Yang, F., Liao, H., Rong, W., Yin, J., Chen, H., Chen, X., et al. (2018). The Xanthomonas effector XopK harbours E3 ubiquitin-ligase activity that is required for virulence. New Phytol. 220, 219–231.

Redditt, T.J., Chung, E.H., Karimi, H.Z., Rodibaugh, N., Zhang, Y., Trinidad, J.C., Kim, J.H., Zhou, Q., Shen, M., Dangl, J.L., et al. (2019). AvrRpm1 Functions as an ADP-Ribosyl Transferase to Modify NOI Domain-Containing Proteins, Including Arabidopsis and Soybean RPM1-Interacting Protein4. Plant Cell *31*, 2664–2681.

Robatzek, S. (2007). Vesicle trafficking in plant immune responses. Cell. Microbiol. *9*, 1–8.

Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. Genes Dev. *20*, 537–542.

Roden, J.A., Belt, B., Ross, J.B., Tachibana, T., Vargas, J., and Mudgett, M.B. (2004). A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during Xanthomonas infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 16624–16629.

Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., and Martin, G.B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. Nature *448*, 370–374.

Roux, B., Bolot, S., Guy, E., Denancé, N., Lautier, M., Jardinaud, M.F., Fischer-Le Saux, M., Portier, P., Jacques, M.A., Gagnevin, L., et al. (2015). Genomics and transcriptomics of Xanthomonas campestris species challenge the concept of core type III effectome. BMC Genomics *16*.

Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Trémousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levaillant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., et al. (2015). A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. Cell *161*, 1074–1088.

Ryan, R.P., Vorhölter, F.J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.A., Bogdanove, A.J., and Dow, J.M. (2011). Pathogenomics of Xanthomonas: Understanding bacterium-plant interactions. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 344–355.

Sabol, P., Kulich, I., and Žárský, V. (2017). RIN4 recruits the exocyst subunit EXO70B1 to the plasma membrane. J. Exp. Bot. *68*, 3253–3265.

Saeed, B., Brillada, C., and Trujillo, M. (2019). Dissecting the plant exocyst. Curr. Opin. Plant Biol. 52, 69–76.

Sandstrom, A., Mitchell, P.S., Goers, L., Mu, E.W., Lesser, C.F., and Vance, R.E. (2019). Functional degradation: A mechanism of NLRP1 inflammasome activation by diverse pathogen enzymes. Science (80-.).

364.

Sarris, P.F., Duxbury, Z., Huh, S.U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S.B., et al. (2015). A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. Cell *161*, 1089–1100.

Sarris, P.F., Cevik, V., Dagdas, G., Jones, J.D.G., and Krasileva, K. V. (2016). Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. BMC Biol. *14*.

Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., and Hirt, H. (2008). The dark side of the salad: Salmonella typhimurium overcomes the innate immune response of arabidopsis thaliana and shows an endopathogenic lifestyle. PLoS One *3*.

Schulze, S., Kay, S., Büttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Krüger, A., Lee, J., Müller, O., Scheel, D., et al. (2012). Analysis of new type III effectors from Xanthomonas uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. New Phytol. *195*, 894–911.

Sekereš, J., Pejchar, P., Šantrůček, J., Vukasinovic, N., Žárský, V., and Potocký, M. (2017). Analysis of exocyst subunit EXO70 family reveals distinct membrane polar domains in Tobacco pollen tubes. Plant Physiol. *173*, 1659–1675.

Seo, D.H., Ahn, M.Y., Park, K.Y., Kim, E.Y., and Kim, W.T. (2016). The N-terminal und motif of the arabidopsis U-box E3 ligase pub18 is critical for the negative regulation of aba-mediated stomatal movement and determines its ubiquitination specificity for exocyst subunit Exo70B1. Plant Cell 28, 2952–2973.

Shimono, M., Lu, Y.-J., Porter, K., Kvitko, B.H., Henty-Ridilla, J., Creason, A., He, S.Y., Chang, J.H., Staiger, C.J., and Day, B. (2016). The Pseudomonas syringae Type III Effector HopG1 Induces Actin Remodeling to Promote Symptom Development and Susceptibility during Infection. Plant Physiol. *171*, 2239 LP – 2255.

Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 575–581.

Sinha, D., Gupta, M.K., Patel, H.K., Ranjan, A., and Sonti, R. V (2013). Cell wall degrading enzyme induced rice innate immune responses are suppressed by the type 3 secretion system effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of Xanthomonas oryzae pv. oryzae. PLoS One 8, e75867.

Sohn, K.H., Zhang, Y., and Jones, J.D.G. (2009). The Pseudomonas syringae effector protein, AvrRPS4, requires in planta processing and the KRVY domain to function. Plant J. *57*, 1079–1091.

Song, C., and Yang, B. (2010). Mutagenesis of 18 type III effectors reveals virulence function of XopZ(PXO99) in Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Mol. Plant. Microbe. Interact. *23*, 893–902.

Soto, G.E., and Hultgren, S.J. (1999). Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. J. Bacteriol. *181*, 1059–1071.

Souza, D.P., Oka, G.U., Alvarez-Martinez, C.E., Bisson-Filho, A.W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N.S., Alegria, M.C., Barbosa, L.R.S., Salinas, R.K., et al. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. Nat. Commun. *6*, 1–9.

Stegmann, M., Anderson, R.G., Ichimura, K., Pecenkova, T., Reuter, P., Žárský, V., McDowell, J.M., Shirasu, K., and Trujillo, M. (2012). The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in Arabidopsis. Plant Cell *24*, 4703–4716.

Stegmann, M., Anderson, R.G., Westphal, L., Rosahl, S., McDowell, J.M., and Trujillo, M. (2014). The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of Arabidopsis thaliana to different pathogens and cell death. Plant Signal. Behav. *8*.

Sukarta, O.C.A., Slootweg, E.J., and Goverse, A. (2016). Structureinformed insights for NLR functioning in plant immunity. Semin. Cell Dev. Biol. *56*, 134–149.

Synek, L., Vukašinović, N., Kulich, I., Hála, M., Aldorfová, K., Fendrych, M., and Žárský, V. (2017). EXO70C2 Is a Key Regulatory Factor for Optimal Tip Growth of Pollen. Plant Physiol. *174*, 223 LP – 240.

Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Cogez, V., Bonas, U., and Büttner, D. (2010). Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv vesicatoria. New Phytol. *187*, 983–1002.

Takken, F.L.W., and Goverse, A. (2012). How to build a pathogen

detector: structural basis of NB-LRR function. Curr. Opin. Plant Biol. 15, 375–384.

Takken, F.L., Albrecht, M., and Tameling, W. Il (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. Curr. Opin. Plant Biol. *9*, 383–390.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731–2739.

Teh O.K. et al. (2019). Phosphorylation of the exocyst subunit Exo70B2 contributes to the regulation of its function. BioRxiv 1–28.

Teper, D., Salomon, D., Sunitha, S., Kim, J.-G., Mudgett, M.B., and Sessa, G. (2014). Xanthomonas euvesicatoria type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. Plant J. *77*, 297–309.

Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A., Liyanapathiranage, P., Iruegas-Bocardo, F., White, F.F., Goss, E.M., and Jones, J.B. (2020). Xanthomonas diversity, virulence and plant–pathogen interactions. Nat. Rev. Microbiol. *18*, 415–427.

Tu, B., Hu, L., Chen, W., Li, T., Hu, B., Zheng, L., Lv, Z., You, S., Wang, Y., Ma, B., et al. (2015). Disruption of OsEXO70A1 Causes Irregular Vascular Bundles and Perturbs Mineral Nutrient Assimilation in Rice. Sci. Rep. *5*, 18609.

Vicente, J.G., and Holub, E.B. (2013). Xanthomonas campestris pv. Campestris (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops.

Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y.-D., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., et al. (2010). Endocytic and Secretory Traffic in Arabidopsis Merge in the Trans-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic Organelle. Plant Cell 22, 1344 LP – 1357.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., and Ivanova, E.P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules *14*, 2535–2554.

Wang, F., Shang, Y., Fan, B., Yu, J.-Q., and Chen, Z. (2014). Arabidopsis LIP5, a Positive Regulator of Multivesicular Body Biogenesis, Is a Critical Target of Pathogen-Responsive MAPK Cascade in Plant Basal Defense. PLOS Pathog. *10*, e1004243.

Wang, G., Roux, B., Feng, F., Guy, E., Li, L., Li, N., Zhang, X., Lautier, M., Jardinaud, M.-F., Chabannes, M., et al. (2015). The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. Cell Host Microbe *18*, 285–295.

Wang, J., Ding, Y., Wang, J., Hillmer, S., Miao, Y., Lo, S.W., Wang, X., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2010). EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in arabidopsis and tobacco cells. Plant Cell 22, 4009–4030.

Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N., Wang, H.W., et al. (2019a). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. Science (80-.). *364*.

Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., Qi, Y., Wang, H.W., Zhou, J.M., and Chai, J. (2019b). Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. Science (80-.). *364*.

Wang, L., Rong, W., and He, C. (2008). Two Xanthomonas extracellular polygalacturonases, pghAxc and pghBxc, are regulated by type III secretion regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. Mol. Plant-Microbe Interact. *21*, 555–563.

Wang, W.-M., Liu, P.-Q., Xu, Y.-J., and Xiao, S. (2016). Protein trafficking during plant innate immunity. J. Integr. Plant Biol. *58*, 284–298.

Wang, W., Wen, Y., Berkey, R., and Xiao, S. (2009). Specific Targeting of the Arabidopsis Resistance Protein RPW8.2 to the Interfacial Membrane Encasing the Fungal Haustorium Renders Broad-Spectrum Resistance to Powdery Mildew. Plant Cell *21*, 2898 LP – 2913.

Wang, W., Liu, N., Gao, C., Rui, L., and Tang, D. (2019c). The Pseudomonas Syringae Effector AvrPtoB Associates With and Ubiquitinates Arabidopsis Exocyst Subunit EXO70B1. Front. Plant Sci. *10*, 1–16. Wang, W., Liu, N., Gao, C., Cai, H., Romeis, T., and Tang, D. (2020). The Arabidopsis exocyst subunits EXO70B1 and EXO70B2 regulate FLS2 homeostasis at the plasma membrane. New Phytol.

Wei, H.L., Zhang, W., and Collmer, A. (2018). Modular Study of the Type III Effector Repertoire in Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 Reveals a Matrix of Effector Interplay in Pathogenesis. Cell Rep. *23*, 1630–1638.

Williams, S.J., Sohn, K.H., Wan, L., Bernoux, M., Sarris, P.F., Segonzac, C., Ve, T., Ma, Y., Saucet, S.B., Ericsson, D.J., et al. (2014). Structural Basis for Assembly and Function of a Heterodimeric Plant Immune Receptor. Science (80-.). *344*, 299 LP – 303.

Wu, B., and Guo, W. (2015). The exocyst at a glance. J. Cell Sci. *128*, 2957–2964.

Wu, C.H., Belhaj, K., Bozkurt, T.O., Birk, M.S., and Kamoun, S. (2016). Helper NLR proteins NRC2a/b and NRC3 but not NRC1 are required for Pto-mediated cell death and resistance in Nicotiana benthamiana. New Phytol. 209, 1344–1352.

Xing, J., Wang, T., Liu, Z., Xu, J., Yao, Y., Hu, Z., Peng, H., Xin, M., Yu, F., Zhou, D., et al. (2015). GENERAL CONTROL NONREPRESSED PROTEIN5-Mediated Histone Acetylation of FERRIC REDUCTASE DEFECTIVE3 Contributes to Iron Homeostasis in Arabidopsis. Plant Physiol. *168*, 1309 LP – 1320.

Žárský, V., Kulich, I., Fendrych, M., and Pečenková, T. (2013). Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways. Curr. Opin. Plant Biol. *16*, 726–733.

Zhai, Q., and Li, C. (2019). The plant Mediator complex and its role in jasmonate signaling. J. Exp. Bot. 70, 3415–3424.

Zhang, C., Brown, M.Q., Van De Ven, W., Zhang, Z.M., Wu, B., Young, M.C., Synek, L., Borchardt, D., Harrison, R., Pan, S., et al. (2016). Endosidin2 targets conserved exocyst complex subunit EXO70 to inhibit exocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E41–E50.

Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., and Guo, W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. J. Cell Biol. *180*, 145–158.

Zhang, Y., Yao, Y., Qiu, X., Wang, G., Hu, Z., Chen, S., Wu, Z., Yuan, N., Gao, H., Wang, J., et al. (2019). Listeria hijacks host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing. Nat. Immunol. *20*, 433–446.

Zhao, T., Rui, L., Li, J., Nishimura, M.T., Vogel, J.P., Liu, N., Liu, S., Zhao, Y., Dangl, J.L., and Tang, D. (2015). A Truncated NLR Protein, TIR-NBS2, Is Required for Activated Defense Responses in the exo70B1 Mutant. PLoS Genet. *11*, 1–28.

Zhu, P.C., Li, Y.M., Yang, X., Zou, H.F., Zhu, X.L., Niu, X.N., Xu, L.H., Jiang, W., Huang, S., Tang, J.L., et al. (2020). Type VI secretion system is not required for virulence on rice but for inter-bacterial competition in Xanthomonas oryzae pv. oryzicola. Res. Microbiol. *171*, 64–73.

Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. Trends Immunol. *35*, 345–351.

ZUCKERKANDL, E., and PAULING, L. (1965). Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. In Evolving Genes and Proteins, V. Bryson, and H.J. Vogel, eds. (Academic Press), pp. 97–166.

Κεφάλαιο 2°

Στο 2° κεφάλαιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάζονται η εισαγωγή και τα αποτελέσματα από την ανάλυση τριών γονιδιωμάτων των βακτηριακών ειδών του γένους *Xanthomonas*. Στο τέλος του κεφαλαίου παρατίθεται η σχετική βιβλιογραφία.

Αλληλούχιση του γονιδιώματος τριών ξανθομονάδων, σημαντικών παθογόνων των φυτών.

Εισαγωγή

Η αλληλούχιση ολοένα και περισσότερων βακτηριακών γονιδιωμάτων αποτελεί σημαντικό επίτευγμα της γονιδιωματικής επιστήμης, για την κατανόηση τόσο της παθογένειας, όσο και των εξελικτικών σχέσεων των μικροοργανισμών. Επιπλέον, καθώς ολοένα και περισσότερες βακτηριακές ασθένειες έρχονται στο προσκήνιο είναι σημαντική η γνώση του γονιδιώματος των αιτιολογικών παραγόντων. Συχνά η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών για την καταπολέμηση των βακτηριακών ασθενειών οδηγεί στην αυξημένη ανθεκτικότητά των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Επομένως, η ανάλυση των μικροβιακών γονιδιωμάτων μπορεί να οδηγήσει και σε ανακάλυψη νέων στόχων των αντιβιοτικών παραγόντων (Donkor, 2013).

Ο πρώτος μικροοργανισμός, του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε πλήρως το 1995, ήταν του Gram αρνητικού βακτηρίου *Haemophilus influenza*, ένα παθογόνο του ανθρώπου (Fleischmann et al., 1995). Στη συνέχεια, ακολούθησε η αλληλούχιση μίας πληθώρας μικροβιακών γονιδιωμάτων, που προέρχονται τόσο από το βασίλειο των Βακτηρίων και των Αρχαίων (Donkor, 2013; Koonin et al., 1996). Στην ταχεία αύξηση γονιδιωματικών αλληλουχίσεων, έχει διαδραματίσει καταλυτικό ρόλο η ραγδαία αύξηση νέων τεχνολογιών αλληλούχισης και βιοπληροφορικής. Στον πίνακα 10, απεικονίζονται συγκριτικά οι διάφορες τεχνολογίες αλληλούχισης, που υπάρχουν διαθέσιμες σήμερα (Donkor, 2013). Βέβαια, 176 παρά τις διαθέσιμες τεχνικές που υπάρχουν, συχνά προκύπτουν διάφορα προβλήματα, όπως ο υψηλός αριθμός των contigs που προκύπτουν ή τα σφάλματα ομοπολυμερών. Αυτά είναι λάθη στον αριθμό των νουκλεοτιδίων, που προκύπτουν όταν ένα νουκλεοτίδιο επαναλαμβάνεται περισσότερο από μία φορά σε μία αλληλουχία. Επομένως, πριν από κάθε αλληλούχιση θα πρέπει να γίνεται μία ακριβής εξέταση των διαθέσιμων μεθόδων και επιλογής της πιο συμφέρουσας κατά περίπτωση (Smits, 2019).

Μέθοδος	Single- Molecule Real-Time Sequencing (Pacific Bio)	Ion Semiconductor (Ion Torrent Sequencing)	Sequencing by Synthesis (Illumina)	Chain Termination (Sanger Sequencing)
Μήκος αλληλούχισης (bp)	2900	200	50-250	400-900
Ακρίβεια	99%	98%	98%	99,9%
Αλληλουχίσεις ανά αντίδραση	35.000- 75.000	έως και 5 εκ.	έως και 3 δις.	N/A
Κόστος ανά 1Mb (US\$)	2	1	0.05-0.15	2400
Πλεονεκτήματα	Γρήγορη μέθοδος και το μεγαλύτερο μήκος αλληλούχισης	Πιο φθηνός εξοπλισμός και αρκετά γρήγορη μέθοδος	Η απόδοση της αλληλούχισης αρκετά υψηλή ανάλογα το μοντέλο του	Μεμονωμένα μεγάλη μήκη αλληλουχίσεων και ευρεία χρήση
			εξοπλισμού	

Πίνακας 50. Συγκριτική απεικόνιση των διαφόρων μεθόδων αλληλούχισης.

Μειονεκτήματα	Όσο η	Επιρρεπής σε	Ο εξοπλισμός	Ο εξοπλισμός
	ακρίβεια	σφάλματα	είναι αρκετά	είναι ακριβός
	είναι υψηλή,	ομοπολυμερών	ακριβός	και δεν
	η απόδοση			ενδείκνυται για
	παραμένει			αλληλουχίσεις
	χαμηλή			μεγάλων
				προγραμμάτων
				(πχ.
				γονιδιώματος)

Η ξανθομονάδα, όπως αναφέραμε προηγουμένως, αποτελεί ένα ευρύ γένος Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων, το οποίο μολύνει περίπου 400 διαφορετικά μονοκότυλα και δικότυλα φυτικά είδη (Timilsina et al., 2020). Στο Κεφάλαιο 1, αναφέρθηκαν εκτενώς οι διάφοροι μηχανισμοί παθογένειας της ξανθομονάδας, καθώς επίσης και τα συμπτώματα που προκαλεί στα φυτά-ξενιστές της. Στη συνέχεια, θα μιλήσουμε συγκεκριμένα για τρία διαφορετικά είδη ξανθομονάδας, των οποίων το γονιδίωμα αλληλουχήσαμε.

Xanthomonas oryzae

Το βακτήριο του είδους Xanthomonas oryzae αποτελείται από δύο παθότυπους, oryzae (Xoo) και oryzicola (Xoc), οι οποίοι και οι δυο προσβάλλουν το μονοκότυλο είδος Oryza sativa (κν. ρύζι), αλλά με διαφορετικούς τρόπους. Το βακτήριο Xoo προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής σήψης (bacterial blight, BB), εισερχόμενο μέσω των αγγείων (ξύλωμα και φλοίωμα) του ρυζιού (Εικ. 35Α). Αντίθετα ο παθότυπος Xoc εισβάλλει στα φυτά μέσω του παρεγχυματικού ιστού τους και τους προκαλεί τη «βακτηριακή ράβδωση» (bacterial leaf streak, BLS) (Εικ. 35B). Τα βακτήρια αυτά είναι υποχρεωτικά αερόβια, μη-σπορογόνα και αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασία μεταξύ 25 και 30° C. Όπως όλες οι ξανθομονάδες, έτσι και αυτά τα είδη αναπτύσσουν χαρακτηριστικές κίτρινες αποικίες, εξαιτίας της ξανθομοναδίνης που παράγουν. Επιπλέον, 178

τα παθογόνα του ρυζιού παράγουν και εξωτερικούς πολυσακχαρίτες (EPS), οι οποίοι τα προστατεύουν έναντι της ξηρασίας και βοηθούν στη διασπορά τους μέσω του αέρα (Niño-Liu et al., 2006). Οι δύο παθότυποι ξεχωρίζουν μεταξύ τους σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια, όπως στην παραγωγή ακετοΐνης (Xoo-, Xoc+), στην αύξηση σε θρεπτικό μέσο που φέρει L-αλανίνη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα (Xoo-, Xoc+) και στην ανθεκτικότητα στο νιτρικό χαλκό συγκέντρωσης 0,001% (Xoo+, Xoc-) (Niño-Liu et al., 2006).

Μέχρις στιγμής, έχουν αλληλουχηθεί τρία γονιδιώματα Xoo: 1) το στέλεχος PXO99^A από τις Φιλιπίννες, που αποτελεί αντιπροσωπευτικό στέλεχος της φυλής 6 (Salzberg et al., 2008), 2) το στέλεχος MAFF 311018 από την Ιαπωνία, που αποτελεί αντιπροσωπευτικό στέλεχος της φυλής 1 (Ochiai et al., 2005) και 3) το στέλεχος KACC10331 από την Κορέα (Lee et al., 2005). Επιπλέον, έχει αλληλουχηθεί και το γονιδίωμα του βακτηρίου *Xoc* στελέχους BLS256 από τις Φιλιπίννες (Bogdanove et al., 2011).

Xanthomonas hortorum

Η ξανθομονάδα του είδους Χ. hortorum (Xhc) δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, όπως άλλα είδη. Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι παθότυποι τους είδους, παρόλα αυτά μόνο για τον παθότυπο carotae έχει πραγματοποιηθεί αλληλούχιση του γονιδιώματος του (Kimbrel et al., 2011). Το βακτήριο αυτό μολύνει τα φύλλα των καρότων (Daucus carota), εισερχόμενο μέσω των στομάτων ή φυσικών πληγών (Εικ. 35Γ). Κατά την εμπορική παραγωγή των σπερμάτων του φυτού, το βακτήριο αποκτά πρόσβαση και καθιερώνεται σε αυτά, εξαιτίας του ημι-άνυδρου κλίματος όπου παράγονται, με αποτέλεσμα στη συνέχεια να γίνεται δύσκολη η καταστολή της ασθένειας με τη χρήση διαφόρων βακτηριοκτόνων (Kimbrel et al., 2011). Για το λόγο αυτό, έχει αναπτυχθεί αυστηρό πρωτόκολλο ανίχνευσης του βακτηρίου στα σπέρματα καρότων πριν από τη σποροπαραγωγή, από τη Διεθνή Ομοσπονδία Σπόρων.

Από την αλληλούχιση του γονιδιώματος του βακτηρίου Xhc και στελέχους Μ081 (απόμονωση από το Όρεγκον, ΗΠΑ) αναγνωρίστηκαν αρκετά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για εξωκυτταρικούς παράγοντες παθογένειας που συμβάλλουν στην παθογένεια του είδους, συμπεριλαμβανομένου των gumN-gumP γονιδίων. Το σύμπλεγμα αυτό γονιδίων κωδικοποιεί για την ξανθάνη, έναν εξωπολυσακγαρίτη (EPS), που συμβάλλει στο σχηματισμό βιοφίλμ και στην παθογένεια της ξανθομονάδας. Επιπλέον, στο βακτήριο αυτό βρέθηκαν οκτώ ομόλογα γονίδια του συμπλέγματος γονιδίων rpf, που κωδικοποιούν για εξωκυτταρικά ένζυμα και πρωτεΐνες που συνθέτουν τον παράγοντα παθογένειας DSF (Diffusible factor, cis-11-methyl-2-dodecenoic acid). Ακόμη, αναγνωρίστηκε και ένα γονίδιο, ομόλογο του βακτηρίου Yersinia pestis, που κωδικοποιεί για μία αντχεσίνη, δύο γονίδια που κωδικοποιούν προϊόντα που συμβάλλουν στην έκκριση αιμολυσίνης, καθώς επίσης και ένα ομόλογο γονίδιο του P. aeruginosa που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση ασπαραγίνης και Ο-αντιγόνου (Kimbrel et al., 2011). Βέβαια, αναγνωρίστηκαν και γονίδια που κωδικοποιούν για συστήματα έκκρισης τύπου IV και III, καθώς επίσης και διάφοροι τελεστές που εκκρίνονται μέσω του T3SS (Kimbrel et al., 2011).

Το παθογόνο του κισσού (Hedera helix L.), Xanthomonas hortorum παθότυπος hederae απομονώθηκε πρώτη φορά στην Ελλάδα το 2013 και συγκεκριμένα στην Ιεράπετρα της Κρήτης (Trantas & Sarris, et al., 2016). Ο παθότυπος αυτός προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης στα φύλλα του κισσού. Οι κηλίδες έχουν μεγάλη διάμετρο (περίπου 5 έως 10 mm) και όσο μεγαλώνουν γίνονται από λευκού χρώματος καφέ (Εικ. 35Ε).

Xanthomonas citri

Το βακτηριακό είδος Χ. citri αποτελείται από αρκετούς παθότυπους και μολύνει δικότυλα φυτά από πολλές οικογένειες (Fabaceae, Rutaceae, Malvaceae, Anacardiaceae, Lythraceae), προκαλώντας σοβαρά ζημιές σε καλλιέργειες και χαρακτηριστικά συμπτώματα των ασθενειών (An et al., 180
2020). Αναφορικά με την παθογένεια του συγκεκριμένου είδους, βρέθηκε ότι διαθέτει ένα εκκριτικό σύστημα τύπου IV (T4SS), με διαφοροποιημένη λειτουργία. Συγκεκριμένα, μέσω του συστήματος αυτού μεταφέρονται τοξικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να σκοτώσουν γειτονικά βακτήρια-ανταγωνιστές του (Souza et al., 2015).

Μέχρι σήμερα, έχει αλληλουχηθεί ο παθότυπος citri, στέλεχος A^W12879, το οποίο απομονώθηκε από τη Φλόριντα των ΗΠΑ και είναι παθογόνο για τα φυτικά είδη Citrus paradisi (γκρέιπφρουτ) και Citrus sinensis (πορτοκαλιά) (Εικ. 35Δ) (Jalan et al., 2013). Επιπλέον, έχουν αλληλουχηθεί και οι παθότυποι malvacearum (φυλές 18 και 20) και mangiferaeindicae (στέλεχος LMG 941), που μολύνουν τα είδη βαμβακιού και μάνγκο, αντίστοιχα (Εικ. 35Ζ, ΣΤ) (Cunnac et al., 2013; Midha et al., 2012).



Εικόνα 35. Απεικόνιση μολυσμένων φυτικών ειδών από διάφορα παθογόνα είδη και παθοτύπους της ξανθομονάδας. Α. Ο παθότυπος Χ. oryzae oryzae (Χοο) προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής σήψης στα φύλλα του ρυζιού. Β. Αντίθετα, ο παθότυπος Χ. oryzae oryzicola (Χοc) προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής ράβδωσης στα φύλλα του ρυζιού. Γ. Χαρακτηριστική προσβολή των φύλλων καρότων από τον παθότυπο carotae του είδους Χ. hortorum. Δ. Καρποί και φύλλα της πορτοκαλιάς που έχουν μολυνθεί από τον παθότυπο Χ.

citri citri. **E**. Μολυσμένα φύλλα κισσού από τον παθότυπο hederae του είδους X. hortorum. **Z**. Μολυσμένα φύλλα και καρπός βαμβακιού από τον παθότυπο malvacearum του είδους X. citri. **ΣΤ**. Μολυσμένα φύλλα και καρποί του είδους μάνγκο από το βακτήριο X. citri παθότυπος mangiferaeindicae.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής, είναι η αλληλούχιση και η ανάλυση των γονιδιωμάτων των ειδών Xanthomonas oryzae παθότυπος oryzicola στέλεχος WHRI 5234 (NCPPB 1585), Xanthomonas hortorum παθότυπος hederae στέλεχος WHRI 7744 (NCPPB 939T) και Xanthomonas citri υποείδος malvacearum στέλεγος WHRI 5232 (NCPPB 633). Τα παραπάνω είδη αποτελούν αντιπροσωπευτικά στελέχη των ειδών βακτηρίων (Type Strains). Από αυτά το Xoc θεωρείται ως επιβλαβής μικροοργανισμός καραντίνας από την Ευρωπαϊκή Ένωση (European Public Prosecutor's Office - EPPO, 2020) Τα παθογόνα αυτά μολύνουν το ρύζι, τον κισσό και το βαμβάκι, αντίστοιχα. Το παθογόνο του ρυζιού έχει απομονωθεί από τη Μαλαισία το 1964. Αντίστοιχα, τα παθογόνα του κισσού και του βαμβακιού έχουν απομονωθεί από τις ΗΠΑ το 1943 και το Σουδάν το 1958. Ακολουθεί μία επισκόπηση των γονιδιωμάτων τους, καθώς επίσης και συγκριτική μελέτη των λειτουργικών στοιγείων που φέρουν.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Αλληλούχιση τριών ειδών του γένους Xanthomonas

Πραγματοποιήσαμε απομόνωση ολικού γενωμικού DNA και εν συνέχεια αλληλούχιση του γονιδιώματος από τρία διαφορετικά στελέχη του γένους *Xanthomonas*, που προκαλούν παθογένεια σε διαφορετικούς φυτικούς ξενιστές, των *Xanthomonas hortorum* παθότυπο *hederae*, *Xanthomonas oryzae* παθότυπο *oryzicola* και *Xanthomonas citri* υποείδους *malvacearum* (Πίν. 11). Στις εικόνες 36, 37 και 38 παρουσιάζονται διάφορα γονιδιωματικά στοιχεία που αφορούν στο γονιδίωμα του κάθε είδους και σε ποιες λειτουργικές κατηγορίες ανήκουν.

Πίνακας 11. Συγκεντρωτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων από την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων τριών ειδών ξανθομονάδων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναρτημένα στη βάση δεδομένων RAST.

	Xanthomor	ıas	Xanthomo	nas	Xanthom	onas
	hortorum	pv.	oryzae	pv.	citri	subsp.
	hederae		oryzicola		malvaced	arum
Type/pathotype	WHRI	7744	WHRI	5234	WHRI	5232
strain	(NCPPB		(NCPPB 1	585)	(NCPPB	633)
	939T)					
Contigs	444		283		179	
Μέγεθος	2.353.466		1.165.726		3.924.87	9
γονιδιώματος						
(bp)						
Περιεχόμενο σε	64,5		64,3		64,9	
(G+C) (%)						
Κωδικές	2034		1085		3368	
αλληλουχίες						
RNAs	13		11		44	



Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος του βακτηρίου Xanthomonas hortorum παθότυπου hederae. Τα στοιχεία έχουν προκύψει από τη βάση δεδομένων RAST.



Εικόνα 37. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος του βακτηρίου Xanthomonas oryzae παθότυπου oryzicola. Τα στοιχεία έχουν προκύψει από τη βάση δεδομένων RAST.



Εικόνα 38. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων λειτουργικών στοιχείων του γονιδιώματος του βακτηρίου Xanthomonas citri υποείδους malvacearum. Τα στοιχεία έχουν προκύψει από τη βάση δεδομένων RAST.

Όσον αφορά την παθογένεια των τριών αυτών ειδών ξανθομονάδας, δε φαίνεται να διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν για τοξίνες και αντχεσίνες. Αντίθετα, μόνο το είδος *X. citri* υποείδος *malvacearum* διαθέτει τρία γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην πρωτεΐνη colicin-E2 της *E. Coli*. Συγκεκριμένα, κωδικοποιεί για τα γονίδια CreB, C και D. Επιπλέον, στο είδος αυτό βρέθηκε και ένα σύμπλεγμα 8 γονιδίων που κωδικοποιούν για την colicin-V ή την παραγωγή άλλων βακτηριοσινών.

Επιπλέον, και τα τρία αλληλουχημένα είδη κωδικοποιούν για γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά και άλλες τοξικές ενώσεις, όπως είναι τα γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα βαρέα μέταλλα και βλακταμάσες. Σύμφωνα με το RAST, δε βρέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν για εκκρινόμενες πρωτεΐνες-τελεστές. Παρόλα αυτά, το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στον κατακερματισμό τους κατά τη διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA ή στη ασυνέχεια κατά την αλληλούχιση.

Για το λόγο αυτό, αναζητήσαμε στη βάση δεδομένων NCBI, όπου έχουν δημοσιευθεί τα BioProjects (*X. hortorum* παθότυπος *hederae*: PRJNA438828, *X. oryzae* παθότυπος *oryzicola*: PRJNA438823 και *X. citri*

υποείδος malvacearum: PRJNA438827) για κάθε ένα είδος ξεχωριστά τους διάφορους τελεστές, που εκκρίνονται από το σύστημα έκκρισης τύπου ΙΙΙ. Στον πίνακα 12 απεικονίζονται οι τελεστές που βρέθηκαν, καθώς επίσης και ο κωδικός τους (Locus number) στη βάση δεδομένων NCBI.

Πίνακας 12. Απεικόνιση των τελεστών, που εκκρίνονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ, μαζί με τον κωδικό τους αριθμό (Locus number) από τη βάση δεδομένων NCBI. Όπου δε βρέθηκε ο συγκεκριμένος τελεστής, που αναγράφεται στην πρώτη στήλη, σημειώνεται με (-).

Τελεστές	Xanthomonas	Xanthomonas	X. citri
	oryzae	hortorum	υποείδος
	παθότυπος	παθότυπος	malvacearum
	oryzicola	hederae	WHRI 5232
	στέλεχος	στέλεχος	
	WHRI 5234	WHRI 7744	
XopP	PUE94453,	PUF01891	PUE89439
	PUE94452		
ХорК	PUE98628	PUF01285	PUE96375
XopI	PUE97529	-	-
XopR	PUE95911	PUF00955	PUE93663
XopAK	PUE97749	-	-
HrpB7	PUE94078	PUF01871	PUE96571
HrpB4	PUE94075	PUF01874	PUE96574
HrpB2	PUE94073	PUF01876	PUE96576
HpaP	PUE94069	-	PUE96579
XopAD	PUE91612	-	-
XopQ	PUE92340	PUF00340	PUE91213
AvrBs3	partially	partially	partially
	sequenced,	sequenced,	sequenced,
	fragmented in	fragmented in	fragmented in
	many locus	many locus	many locus
	numbers	numbers	numbers
SctP	-	PUF01902	-
HopG1	-	PUF01807,	PUE91815
		PUE93156	

ХорХ	PUE93731	PUF01817	PUE91720
XopN	PUE93152	PUF00904	-
Type-III	PUE91837	PUE99366	PUE90560
pantothenate			
kinase			
XopB	-	PUE99497	-
AvrXccC	-	PUE93971,	-
		PUE92203	
AvrBs1	-	PUE92420	-
AvrXccA1	-	-	PUE91172
XopC	-	-	PUE89478
XopE3	-	-	PUE89356
XopE2	-	-	PUE89268,
			PUE93671
AvrBs2	-	-	PUE93017
HopAF1	-	-	PUE89834

Εκτός από τους T3EPs, βρέθηκαν και στα τρία αλληλουχημένα είδη πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από συντηρημένα γονίδια της συσκευής έκκρισης τύπου ΙΙΙ, όπως η πρωτεΐνη «δαχτυλίδι» της εξωτερικής και οικογένειας εσωτερικής μεμβράνης της EscC/YscC/HrcC και EscJ/YscJ/HrcJ, αντίστοιχα. Επίσης βρέθηκαν η αντλία ATP (ATPase) της οικογένειας EscN/YscN/HrcN, οι πρωτεΐνες HrpE/YscL, HrpB1, YscQ/HrcQ, καθώς επίσης και πρωτεΐνες εξόδου των οικογενειών EscV/YscV/HrcV EscU/YscU/HrcU, και EscR/YscR/HrcR, EscS/YscS/HrcS. Τέλος, εκτός από το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ, βρέθηκαν και στα τρία αλληλουχημένα είδη, πρωτεΐνες των εκκριτικών συστημάτων τύπου Ι, ΙΙ, ΙV και VΙ και πρωτεΐνες που εκκρίνονται από αυτά.

Υλικά και Μέθοδοι Βακτηριακά είδη και στελέχη

Xanthomonas

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήσαμε τα είδη X. oryzae παθότυπος oryzicola στελέχους WHRI 5234 (NCPPB 1585), Xanthomonas hortorum παθότυπος hederae στελέχους WHRI 7744 (NCPPB 939T) και Xanthomonas citri υποείδος malvacearum στελέχους WHRI 5232 (NCPPB 633). Τα είδη αυτά αναπτύχθηκαν σε στέρεη θρεπτική καλλιέργεια NA broth, σύστασης 0,6% πεπτόνης A, 0,1% εκχύλισμα από βοοειδή, 0,2% εκχύλισμα ζύμης, 0,5% χλωριούχου νατρίου και 1,5% άγαρ, pH 7.3, με αερισμό στους 28 °C, χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού, για έως και 4 ημέρες. Στη συνέχεια, αφού διαπιστώθηκε η ύπαρξη αμιγούς καλλιέργειας, προχωρήσαμε σε υγρή καλλιέργεια.

Απομόνωση γενωμικού DNA

Για την αλληλούχιση των τριών αυτών ειδών, απομονώσαμε το γενωμικό τους DNA, με τη χρήση της μεθόδου CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Minas et al., 2011). Η επαναδιάλυση των gDNAs έγινε με διάλυμα TE (10 mM TRIS και 0.1 mM EDTA, pH 8.0), σύμφωνα με τις προδιαγραφές της πλατφόρμας αλληλούχισης (http://biosciences.exeter.ac.uk/sequencing/experiment/samples/illumina/).

Αλληλούχιση των βακτηριακών γονιδιωμάτων

Η αλληλούχιση των τριών βακτηριακών γονιδιωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πλατφόρμας αλληλούχισης Illumina MiSeq επόμενης γενιάς, από το Κέντρο Αλληλούχισης του Πανεπιστημίου του Exeter (http://sequencing.exeter.ac.uk). Δημιουργήθηκαν 2,6 εκατομμύρια, 1,5 εκκατομύρια και 1,6 εκατομμύρια ζεύγη αλληλουχίσεων μήκους 300 νουκλεοτιδίων για τα είδη Xhh, Xoc και Xcm, αντίστοιχα. Τα άκρα των αλληλουχιών κόπηκαν με το TrimGalore (https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore) και συναρμολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPAdes version 3.11.1 (Bankevich et al., 2012).

Βιβλιογραφία

An, S.Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.J., He, Y.Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., et al. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. FEMS Microbiol. Rev. *44*, 1–32.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. *19*, 455–477.

Bogdanove, A.J., Koebnik, R., Lu, H., Furutani, A., Angiuoli, S. V., Patil, P.B., Van Sluys, M.A., Ryan, R.P., Meyer, D.F., Han, S.W., et al. (2011). Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic Xanthomonas spp. J. Bacteriol. *193*, 5450–5464.

Cunnac, S., Bolot, S., Serna, N.F., Ortiz, E., Szurek, B., Noël, L.D., Arlat, M., Jacques, M.A., Gagnevin, L., Carrere, S., et al. (2013). High-quality draft genome sequences of two Xanthomonas citri pv. malvacearum strains. Genome Announc. *1*, 4–5.

Donkor, E.S. (2013). Sequencing of bacterial genomes: Principles and insights into pathogenesis and development of antibiotics. Genes (Basel). *4*, 556–572.

EPPO (2020). eppo A1 and A2 pests for recommendation as quarantine pests. p.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science (80-.). *269*, 496–512.

Jalan, N., Kumar, D., Yu, F., Jones, J.B., Graham, J.H., and Wang, N. (2013). Complete genome sequence of Xanthomonas citri subsp. citri strain AW12879, a restricted-host-range citrus canker-causing bacterium. Genome Announc. *1*, 4–5.

Kimbrel, J.A., Givan, S.A., Temple, T.N., Johnson, K.B., and Chang, J.H. (2011). Genome sequencing and comparative analysis of the carrot bacterial blight pathogen, Xanthomonas hortorum pv. carotae M081, for

insights into pathogenicity and applications in molecular diagnostics. Mol. Plant Pathol. 12, 580–594.

Koonin, E. V., Mushegian, A.R., and Rudd, K.E. (1996). Sequencing and analysis of bacterial genomes. Curr. Biol. *6*, 404–416.

Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., et al. (2005). The genome sequence of Xanthomonas oryzae pathovar oryzae KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Res. *33*, 577–586.

Midha, S., Ranjan, M., Sharma, V., Pinnaka, A.K., and Patil, P.B. (2012). Genome sequence of xanthomonas citri pv. Mangiferaeindicae strain LMG 941. J. Bacteriol. *194*, 3031.

Minas, K., McEwan, N.R., Newbold, C.J., and Scott, K.P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. FEMS Microbiol. Lett. *325*, 162–169.

Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C., and Bogdanove, A.J. (2006). Xanthomonas oryzae pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. *7*, 303–324.

Ochiai, H., Inoue, Y., Takeya, M., Sasaki, A., and Kaku, H. (2005). Genome Sequence of Xanthomonas oryzae pv. oryzae Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity. Japan Agric. Res. Q. JARQ *39*, 275– 287.

Salzberg, S.L., Sommer, D.D., Schatz, M.C., Phillippy, A.M., Rabinowicz, P.D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A.L., Kelley, D., et al. (2008). Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A. BMC Genomics *9*, 1–16.

Smits, T.H.M. (2019). The importance of genome sequence quality to microbial comparative genomics. BMC Genomics 20, 2–5.

Souza, D.P., Oka, G.U., Alvarez-Martinez, C.E., Bisson-Filho, A.W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N.S., Alegria, M.C., Barbosa, L.R.S., Salinas, R.K., et al. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. Nat. Commun. *6*, 1–9.

Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A., Liyanapathiranage, P., Iruegas-Bocardo, F., White, F.F., Goss, E.M., and Jones, J.B. (2020). Xanthomonas diversity, virulence and plant–pathogen interactions. Nat. Rev. Microbiol. *18*, 415–427.

Trantas, E.A., Sarris, P.F., Mpalantinaki, E., Papadimitriou, M., Ververidis, F., and Goumas, D.E. (2016). First Report of Xanthomonas hortorum pv. hederae Causing Bacterial Leaf Spot on Ivy in Greece. Plant Dis. *100*, 2158.

Παράρτημα Ι

<u>Διάλυμα LB.</u>

1% tryptone (Sigma, T9410), 0,5% yeast extract (Sigma, 70161), 1% sodium chloride (Merck, 1.06404), 1,5% agar (Applichem, A0949) (μόνο για στερεές καλλιέργειες).

Διάλυμα YPDA.

2% peptone (Applichem, 403695.1210), 1% yeast extract (Sigma, 70161), 2% dextrose (Riedel, 16301), Adenine 0.003% (Applichem, A0939), 2% agar (Applichem, A0949) (μόνο για στερεές καλλιέργειες).

Επιμέρους συστατικά	Γρ/100 ml	Διαλύτης
Amino acid mixture -LWAMHU (MP,	0,055	
Biomedicals, 4560222)		
YNB (MP Biomedicals, 4027512)	0,67	
Dextrose (Glucose)	2	
Agar (μόνο για στερεή καλλιέργεια)	2	
Ουρακίλη (100x) (Applichem, A0667)	0,2	-
Στοκ αδενίνης (100x) (Applicem, A0949)	0,4	0,5 M HCl
Στοκ ιστιδίνης (100x) (Applichem, A3733)	0,2	H ₂ O
Στοκ μεθειονίνης (66x) (Applichem,	1	H ₂ O
A1340)		

Φτωχό διάλυμα ζύμης και στοκ αμινοξέων.

<u>Φτωχό διάλυμα ζύμης με X-gal υπόστρωμα.</u>

Τα πιάτα με τη στερεή καλλιέργεια προετοιμάζονται όπως παραπάνω, με τη διαφορά ότι προστίθεται X-gal σε τελική συγκέντρωση 0,08 mg/ml και 1x διαλύματος BU Salts (10x stock διάλυμα BU salts, 100 ml: 7 gr Na₂HPO₄*7H₂O, 3 gr NaH₂PO₄ ή 3,45 gr NaH₂PO₄*H₂O, <u>pH=7.0</u>), μετά την αποστείρωση του διαλύματος. Το διαλύμα BU salts, αφού αποστειρωθεί, φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

<u>Διάλυμα TBS/TBST, 10x.</u>

Επιμέρους συστατικά Τελική Συγκέντρωση (10x)	Γρ/1 lt
--	---------

NaCl	1,5 M	87,66
Tris pH 7,6	200 mM	0,2 ml (1 M stock)
H ₂ O		Μέχρι 1 λτ.
*П	(/	TDCT =1

*Προσθήκη Tween-20 (στην περίπτωση του TBST) σε τελική συγκέντρωση 0,1% ό/ό ή 0,05% ό/ό (για τα πρωτεϊνικά από τις ζύμες).

<u>Διάλυμα Protein running buffer, 10x.</u>

Επιμέρους	συστατικά	Τελική Συγκέντρωση	$\Gamma \rho / 1$ lt
(10x)			
Tris		125 mM	30,285
Glycine		96 mM	14,413
SDS		0,5% β/ο	10
H ₂ O			Μέχρι 1 λτ.

<u>Διάλυμα Transfer buffer, 10x.</u>

Επιμέρους	συστατικά	Τελική Συγκέντρωση	$\Gamma \rho / 1$ lt
(10x)			
Tris		25 mM	30,3
Glycine		150 mM	112,6
SDS		0,25% β/ο	5
H ₂ O			Μέχρι 1 λτ.

*Προσθήκη στο 1x διάλυμα 10% μεθανόλη (δηλαδή 100 ml στο 1 λίτρο).

Διάλυμα χρωστικής πρωτεϊνών, 6χ.

Τελική	Αρχική	50 ml
Συγκέντρωση	Συγκέντρωση	
375 mM	1M	18,75
40% β/o	100% β/o	20
5% β/ο	20% β/ο	12,5
1% β/ο	-	0,5 γρ
		Μέχρι τα 50 ml
	Τελική Συγκέντρωση 375 mM 40% β/ο 5% β/ο 1% β/ο	ΤελικήΑρχικήΣυγκέντρωσηΣυγκέντρωση375 mM1M40% β/ο100% β/ο5% β/ο20% β/ο1% β/ο-

*Προσθήκη επιπλέον 50 mM DTT, κάθε φορά φρέσκο.

Διάλυμα GTEN-Πρωτεϊνική λύση από φυτά

Επιμέρους	Τελική	Αρχική	100 ml
συστατικά	Συγκέντρωση	Συγκέντρωση	
Tris-Cl pH 8.0	100 mM	1M	10

Glycerol	10% β/o	100% β/o	10
EDTA	1 mM	0,5 M	0,2
NaCl	150 mM	5 M	3
H ₂ O			Μέχρι τα 100 ml

* Προσθήκη επιπλέον 5 mM DTT, protease inhibitors και 0,2 % ό/ό NP-40, κάθε φορά <u>φρέσκα</u>.

Διάλυμα πρωτεϊνικής λύσης από ζύμη

Επιμέρους	Τελική	Αρχική	100 ml
συστατικά	Συγκέντρωση	Συγκέντρωση	
Tris-Cl pH 6.8	0,06 M	1M	6
Glycerol	10% β/ό	100% β/ó	10
SDS	2 % β/ό	20 % β/ó	10
H ₂ O			Μέχρι τα 100 ml

* Προσθήκη επιπλέον χρωστική πρωτεϊνών σε τελική συγκέντρωση 1x.

Παράρτημα ΙΙ

A/A	Πλασμιδιακή	Τελικός φορέας	Ενθέματα (άκρα)	Αντιβιοτικό	
	κατασκευή		• • • • •	επιλογής	
1	pGADT7-AvrBs2	pGADT7	AvrBs2 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
				ug/ml	
2	pGADT7-XopK	pGADT7	XopK (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
				ug/ml	
3	pGADT7-XopL	pGADT7	XopL (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
4	pGAD17-XOPN	pGAD17	XOPN (AATG-GCTT)	Αμπικιλλινη 100	
5	nCADT7 VonD		VecVonB 1st part (AATG TTGC)		
5	pGAD17-X0pP	pGADT	XccXopP-1st part (AATG-11GC),		
6	nGADT7-XonO	nGADT7		Διιπικιλλίνη 100	
0					
7	pGADT7-XopR	pGADT7	XopR (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
-	P	P		ug/ml	
8	pGADT7-XopX1	pGADT7	XopX1 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
				ug/ml	
9	pGADT7-XopX2	pGADT7	XopX2 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
				ug/ml	
10	pGADT7-XopZ	pGADT7	XopZ (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
				ug/ml	
11	pGADT7-XopO	pGADT7	XopO (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
- 12		04077		ug/ml	
12	pGAD17-XopS	pGAD17	XopS (AAIG-GCII)	Αμπικιλλινη 100	
12					
15	pGAD17-POPP2	pGADT			
14	nGADT7-AvrRns4	nGADT7	AvrRns4 (AATG-GCTT)	Διιπικιλλίνη 100	
		ponerr		ug/ml	
				Καναμυκίνη 50	
15	pGBKT7:AtWRKY	pGBKT7	AtWRKY ID (AATG-GCTT)	ug/ml	
16	pGBKT7-B3	pGBKT7	B3 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50	
				ug/ml	
17	pGBKT7-CG	pGBKT7	CG (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50	
				ug/ml	
18	pGBKT7-Exo70	pGBKT7	Exo70 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50	
				ug/ml	
10	pGBKT7-HSF	pGBKT7	HSF (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50	
19					
20	POBKI7-KINASE_C	равкі	Kinase-C (TKD/DFG) (AATG-GCTT)	καναμυκινή 50	
20	nGBKT7-Kinasa N/C	nGBKT7			
21	010)			ug/ml	

	pGBKT7-Kinase_N	pGBKT7	Kinase-N (C153) (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
22	(C153)			ug/ml
	pGBKT7-PP2C	pGBKT7	PP2C (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
23				ug/ml
	pGBKT7-TRX_C	pGBKT7	TRX_C (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
24				ug/ml
	pGBKT7- <i>Hvv</i> WRKYs_C	pGBKT7	WRKY_C (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
25				ug/ml
	pGBKT7-	pGBKT7	ZFBED_N_C045 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
26	ZFBED_N_C045			ug/ml
	pGBKT7-	pGBKT7	ZFBED_N_C350 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
27	ZFBED_N_C350			ug/ml
	pGBKT7- <i>Os</i> WRKY	pGBKT7	WRKY (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
28				ug/ml
	pGBKT7-HMA	pGBKT7	HMA (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
29				ug/ml
	pGBKT7-TCP	pGBKT7	TCP (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
30				ug/ml
	pGBKT7-LIM	pGBKT7	LIM (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
31				ug/ml
	pGBKT7-U_Box	pGBKT7	U-Box (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
32				ug/ml
	pGBKT7-TFSIIN	pGBKT7	TFSIIN (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
33				ug/ml
	pGBKT7-ZnF_C3H1	pGBKT7	ZnF_C3H1 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
34				ug/ml
	pGBKT7-TIR	pGBKT7	TIR (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
35		0.01/77		ug/ml
	pGBK17-AtEXO70B1	рдвкти	AtEXO/0B1-1st part (AATG-TICC),	Καναμυκινη 50
			AtEXO70B1-2nd part (TICC-TAGG),	ug/mi
			ATEXO/UBI-3rd part (TAGG-TTCG)	
36				
	pGADT7-AtEXO70B1	pGADT7	AtEXO70B1-1st part (AATG-TTCC),	Αμπικιλλίνη 100
			AtEXO70B1-2nd part (TTCC-TAGG),	ug/ml
			AtEXO70B1-3rd part (TAGG-TTCG)	
37				
	pGBKT7-	pGBKT7	AtEXO70B1_AB (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
38	AtEXO70B1_AB			ug/ml
	pGBKT7-	pGBKT7	AtEXO70B1_BC(AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
39	AtEXO70B1_BC			ug/ml
	pGBKT7-	pGBKT7	AtEXO70B1_CD (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
40	AtEXO70B1_CD			ug/ml
	pGADT7 <i>-Xcc</i> XopP	pGADT7	XccXopP-1st part (AATG-TTGC),	Αμπικιλλίνη 100
41			XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT)	ug/ml

	pGBKT7 <i>-Xcc</i> XopP	pGBKT7	XccXopP-1st part (AATG-TTGC),	Καναμυκίνη 50	
42			XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT)	ug/ml	
	pGADT7 <i>-Xcc</i> XopP_N	pGADT7	XccXopP_N (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
43				ug/ml	
	pGADT7 <i>-Xcc</i> XopP_C	pGADT7	XccXopP_C (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100	
44				ug/ml	
45	pGBK17-XccXopP_N	pGBK17	XCCXOPP_N (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50	
45	DCRKTZ VccVonD C	pCP/T7	YeeYopB C (AATC CCTT)		
46		POBR17		ug/ml	
10	pICH86988-	pICH86988	AtEXO70B1-1st part (AATG-TTCC).	Καναμυκίνη 50	
	AtExo70B1-nVenus		AtEXO70B1-2nd part (TTCC-TAGG),	ug/ml	
			AtEXO70B1-3rd part (TAGG-TTCG),		
			nVENUS TTCG-GCTT		
47					
	pICH86988-	pICH86988	AtEXO70B1-1st part (AATG-TTCC),	Καναμυκίνη 50	
	AtExo70B1-cCFP		AtEXO70B1-2nd part (TTCC-TAGG),	ug/ml	
			AtEXO70B1-3rd part (TAGG-TTCG),		
			CCFP TTCG-GCTT		
48					
	pICH86988-	pICH86988	AtEXO70B1-1st part (AATG-TTCC),	Καναμυκίνη 50	
	AtExo70B1-YFP		AtEXO70B1-2nd part (TTCC-TAGG),	ug/ml	
			ATEXU/UBI-3rd part (TAGG-TTCG),		
49				Kanana (m. 50	
	picH86988-	ріснабува	ATEXO70B1-1st part (AATG-TTCC),	καναμυκινή 50	
	ALLXO/OD1-IIICHEITy		AtEXO70B1-2nd part (TAGG-TTCG)	ug/III	
			mCherry TTCG-GCTT		
50					
50	pICH86988-	pICH86988	AtEXO70B1-1st part (AATG-TTCC)	Καναμμκίνη 50	
	AtExo70B1-HF	pronocce	AtEXO70B1-2nd part (TTCC-TAGG),	ug/ml	
			AtEXO70B1-3rd part (TAGG-TTCG),		
			HF TTCG-GCTT		
51					
	pICH86988-	pICH86988	AtEXO70B1-1st part (AATG-TTCC),	Καναμυκίνη 50	
	AtExo70B1-myc		AtEXO70B1-2nd part (TTCC-TAGG),	ug/ml	
			AtEXO70B1-3rd part (TAGG-TTCG),		
			myc TTCG-GCTT		
52					
	pICH86988-XccXopP-	pICH86988	XccXopP-1st part (AATG-TTGC),	Καναμυκίνη 50	
	nVenus		XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT),	ug/ml	
53			nVENUS TTCG-GCTT		

54	pICH86988-XccXopP- pICH86988 XccXopP-1st part (AATG-TTGC), cCFP XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT), 4 CCFP TTCG-GCTT		Καναμυκίνη 50 ug/ml	
55	pICH86988-XccXopP- YFP	pICH86988	XccXopP-1st part (AATG-TTGC), XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT), YFP TTCG-GCTT	Καναμυκίνη 50 ug/ml
56	plCH86988-XccXopP- mCherry	pICH86988 XccXopP-1st part (AATG-TTGC), XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT), mCherry TTCG-GCTT		Καναμυκίνη 50 ug/ml
57	pICH86988-XccXopP- eCFP	- pICH86988 XccXopP-1st part (AATG-TTGC), XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT), eCFP TTCG-GCTT		Καναμυκίνη 50 ug/ml
58	pICH86988-XccXopP- HF	pICH86988	8 XccXopP-1st part (AATG-TTGC), XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT), HF TTCG-GCTT	
59	pICH86988-XccXopP- myc	38-XccXopP- pICH86988 XccXopP-1st part (AATG-TTGC), XccXopP-2nd part (TTGC-GCTT), myc TTCG-GCTT		Καναμυκίνη 50 ug/ml
60	pGBKT7- AtExo70A1_splice form 1	pGBKT7	AtExo70A1-1st part (AATG-CTCA), AtExo70A1-2nd part (CTCA-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
61	pGBKT7- AtExo70A1_splice form 2	splice pGBKT7 AtExo70A1-1st part (AATG-CTCA) AtExo70A1-2nd part (CTCA-GCTT		Καναμυκίνη 50 ug/ml
62	pGBKT7-AtExo70F1	pGBKT7	AtExo70F1-1st part (AATG-TGTT), AtExo70F1-2nd part (TGTT-ATGG), AtExo70F1-3rd part (ATGG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
	pICH86988- AtExo70F1-nVenus	pICH86988	AtExo70F1-1st part (AATG-TGTT), AtExo70F1-2nd part (TGTT-ATGG), AtExo70F1-3rd part (ATGG-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
63	pICH86988- AtExo70F1-cCFP	pICH86988	AtExo70F1-1st part (AATG-TGTT), AtExo70F1-2nd part (TGTT-ATGG), AtExo70F1-3rd part (ATGG-TTCG), cCFP (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
65	pGBKT7-AtExo70B2	рGBKT7	AtExo70B2 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
66	pGBKT7- ObExo70B1_small	рGBKT7	ObExo70B1_small (AATG-GCTT)	
67	pGBKT7- ObExo70B1_small_K1 34E	pGBKT7	ObExo70B1_small 1st part (AATG- CTCA), ObExo70B1_small 2nd part (CTCA-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml

	pICH86988-	pICH86988	H86988 ObExo70B1_small (AATG-TTCG),	
	ObExo70B1_small-		nVenus (TTCG-GCTT)	ug/ml
68	nVenus			
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_small 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_small-		CTCA), ObExo70B1_small 2nd part	ug/ml
	nVenus_K134E		(CTCA-GCTT), nVenus (TTCG-GCTT)	
69				
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_small (AATG-TTCG), HF	Καναμυκίνη 50
70	ObExo70B1_small-HF		(TTCG-GCTT)	ug/ml
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_small 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_small-HF-		CTCA), ObExo70B1_small 2nd part	ug/ml
	K134E		(CTCA-GCTT), HF (TTCG-GCTT)	
71				
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_small (AATG-TTCG),	Καναμυκίνη 50
72	ObExo70B1_small-YFP		YFP (TTCG-GCTT)	ug/ml
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_small 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_small-		CTCA), ObExo70B1_small 2nd part	ug/ml
	YFP_K134E		(CTCA-GCTT), YFP (TTCG-GCTT)	
73				
	pGBKT7-	pGBKT7	ObExo70B1_large 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_large		TACA), ObExo70B1_large 2nd part	ug/ml
74			(TACA-GCTT)	
	pGBKT7-	pGBKT7	ObExo70B1_large 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_large_K36		CTCA), ObExo70B1_large 2nd part	ug/ml
75	8E		(CTCA-GCTT)	
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_large 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_large-		TACA), ObExo70B1_large 2nd part	ug/ml
	nVenus		(TACA-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)	
76				
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_large 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_large-		CTCA), ObExo70B1_large 2nd part	ug/ml
	nVenus_K368E		(CTCA-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)	
77				
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_large 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_large-YFP		TACA), ObExo70B1_large 2nd part	ug/ml
			(TACA-TTCG), YFP (TTCG-GCTT)	
78				
	pICH86988-	pICH86988	ObExo70B1_large 1st part (AATG-	Καναμυκίνη 50
	ObExo70B1_large-		CTCA), ObExo70B1_large 2nd part	ug/ml
	YFP_K368E		(CTCA-TTCG), YFP (TTCG-GCTT)	
79				
	pICH86988-	pICH86988	AtExo70B1-1st part (AATG-CTCG),	Καναμυκίνη 50
		-	• • •	
	AtExo70B1_E347K-YFP		AtExo70B1-2nd part (CTCG-TTCG),	ug/ml

	pICH86988- AtExo70B1_E347K-	pICH86988	AtExo70B1-1st part (AATG-CTCG), AtExo70B1-2nd part (CTCG-TTCG),	Καναμυκίνη 50 ug/ml
81	livenus			
82	pGADT7-XocXopP1	pGADT7	XocXopP1 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
83	pGADT7-XocXopP2	pGADT7	XocXopP2 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
84	pGADT7-RsHlk3	pGADT7	ADT7 RsHlk3 1st part (AATG-GGAT), RsHlk3 2nd part (GGAT-GCTT)	
85	pGADT7-AcXopP	pGADT7	AcXopP (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
86	pGADT7-AvrRps4c	pGADT7	AvrRps4c (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
87	pICH86988-AvrRps4c- nVenus	pICH86988	AvrRps4c (AATG-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
88	pICH86988-AvrRps4c- cCFP	AvrRps4c- pICH86988 AvrRps4c (AATG-TTCG), cCFP (TTCG-GCTT)		Καναμυκίνη 50 ug/ml
89	pICH86988-AvrRps4c- HF	CH86988-AvrRps4c- pICH86988 AvrRps4c (AATG-TTCG), HF (TTCG- GCTT)		Καναμυκίνη 50 ug/ml
90	pICH86988-AvrRps4c- myc	CH86988-AvrRps4c- pICH86988 AvrRps4c (AATG-TTCG), myc (TTCG- yc GCTT)		Καναμυκίνη 50 ug/ml
91	pGADT7-XopP-100	pGADT7	XccXopP (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
92	pGADT7-XopP-100 until 421	pGADT7	XccXopP (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
93	pICH86988-RFP-GFP	pICH86988	RFP (AATG-TTCG), GFP (TTCG- GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
94	pICSL869000D- 35S::PR1sp-RFP-GFP- NOST	pICSL86900OD	35Sp (GGAG-CCAT), PR1sp (CCAT- AATG), RFP (AATG-TTCG), GFP (TTCG-GCTT), NOST (GCTT-CGCT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
95	pGBKT7-AtSec3A	рGBKT7	AtSec3A (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
96	pGADT7-AtSec3A	pGADT7	AtSec3A (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
97	pICH86988-AtSec3A- YFP	pICH86988	H86988 AtSec3A (AATG-TTCG), YFP (TTCG- GCTT)	
98	pICH86988-AtSec3A- nVenus	pICH86988	AtSec3A (AATG-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
99	pICH86988-AtSec3A- cCFP	pICH86988	AtSec3A (AATG-TTCG), cCFP (TTCG- GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
100	pGBKT7-AtSec5A	pGBKT7	AtSec5A 1st part (AATG-CAGG), AtSec5A 2nd part (CAGG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml

101	pGADT7-AtSec5A	pGADT7	AtSec5A 1st part (AATG-CAGG), AtSec5A 2nd part (CAGG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml	
102	plCH86988-AtSec5A- myc	pICH86988	AtSec5A 1st part (AATG-CAGG), AtSec5A 2nd part (CAGG-TTCG), myc (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
103	pICH86988-AtSec5A-pICH86988AtSec5A 1st part (AATG-CAGG), AtSec5A 2nd part (CAGG-TTCG), YFP (TTCG-GCTT)		Καναμυκίνη 50 ug/ml		
104	pICH86988-AtSec5A- cCFP pICH86988 AtSec5A 1st part (AATG-CAGG), AtSec5A 2nd part (CAGG-TTCG), cCFP (TTCG-GCTT)		AtSec5A 1st part (AATG-CAGG), AtSec5A 2nd part (CAGG-TTCG), cCFP (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
105	pGBKT7-AtSec6	pGBKT7	AtSec6 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
106	pGADT7-AtSec6	pGADT7	AtSec6 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml	
107	pGBKT7-AtSec8	pGBKT7	AtSec8 1st part (AATG-CAGC), AtSec8 2nd part (CAGC-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
108	pGADT7-AtSec8	pGADT7	AtSec8 1st part (AATG-CAGC), AtSec8 2nd part (CAGC-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml	
109	pGBKT7-AtSec10	KT7-AtSec10 pGBKT7 AtSec10 (AATG-GCTT)		Καναμυκίνη 50 ug/ml	
110	pGADT7-AtSec10	pGADT7	AtSec10 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml	
111	pICH86988-AtSec10- nVenus	pICH86988	86988 AtSec10 (AATG-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)		
112	pICH86988-AtSec10- cCFP	pICH86988	AtSec10 (AATG-TTCG), cCFP (TTCG- GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
113	pICH86988-AtSec10- YFP	pICH86988	AtSec10 (AATG-TTCG), YFP (TTCG- GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
114	pGBKT7-AtSec15A	pGBKT7	AtSec15A (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
115	pGADT7-AtSec15A	pGADT7	AtSec15A (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml	
116	pGBKT7-AtSec15B	pGBKT7	AtSec15B (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
117	pGADT7-AtSec15B	pGADT7	AtSec15B (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml	
118	pICH86988-AtSec15B- nVenus	pICH86988	AtSec15B (AATG-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
119	pICH86988-AtSec15B- cCFP	pICH86988	AtSec15B (AATG-TTCG), cCFP (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	
120	pICH86988-AtSec15B- YFP	pICH86988	AtSec15B (AATG-TTCG), YFP (TTCG- GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml	

	pICH86988-AtSec15B-	pICH86988	AtSec15B (AATG-TTCG), HF (TTCG-	
121	HF		GCTT)	ug/ml
122	pICH86988-AtSec15B- myc	pICH86988	AtSec15B (AATG-TTCG), myc (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
	pGBKT7-AtExo84B	pGBKT7	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA),	Καναμυκίνη 50
123			AtExo84B 3rd part (GAGC-GCTT)	ug/III
	pGADT7-AtExo84B	pGADT7	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA),	Αμπικιλλίνη 100
124			AtExo84B 3rd part (GAGC-GCTT)	ug/im
125	pICH86988-AtExo84B- nVenus	pICH86988	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA), AtExo84B 2nd part (TGGA-GAGC), AtExo84B 3rd part (GAGC-TTCG), nVenus (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
126	pICH86988-AtExo84B- cCFP	pICH86988	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA), AtExo84B 2nd part (TGGA-GAGC), AtExo84B 3rd part (GAGC-TTCG), cCFP (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
127	pICH86988-AtExo84B- YFP	pICH86988	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA), AtExo84B 2nd part (TGGA-GAGC), AtExo84B 3rd part (GAGC-TTCG), YFP (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
128	pICH86988-AtExo84B- HF	pICH86988	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA), AtExo84B 2nd part (TGGA-GAGC), AtExo84B 3rd part (GAGC-TTCG), HF (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
129	pICH86988-AtExo84B- myc	pICH86988	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA), AtExo84B 2nd part (TGGA-GAGC), AtExo84B 3rd part (GAGC-TTCG), myc (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
130	pICH86988-AtExo84B- nCerulean	pICH86988	AtExo84B-1st part (AATG-TGGA), AtExo84B 2nd part (TGGA-GAGC), AtExo84B 3rd part (GAGC-TTCG), nCerulean (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
121	pGBKT7-AtExo84C	pGBKT7	AtExo84C (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50
131	pGADT7-AtExo84C	pGADT7	AtExo84C (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
133	pGBKT7-AtTN2	pGBKT7	AtTN2 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
134	pICH86988-AtTN2-YFP	pICH86988	AtTN2 (AATG-TTCG), YFP (TTCG- GCTT)	καναμυκίνη 50 ug/ml

135	pGBKT7-BnTN2	pGBKT7	BnTN2 1st part (AATG-TAAC), BnTN2 2nd part (TAAC-TAGA), BnTN2 3rd part (TAGA-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
136	pICH86988-BnTN2-YFP	pICH86988	ICH86988 BnTN2 1st part (AATG-TAAC), BnTN2 2nd part (TAAC-TAGA), BnTN2 3rd part (TAGA-TTCG), YFP (TTCG-GCTT)	
137	pGBKT7-Chp7	рGBКТ7	Chp7 1st part (AATG-GTTC), Chp7 2nd part (GTTC-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
138	pGADT7-Chp7	pGADT7	Chp7 1st part (AATG-GTTC), Chp7 2nd part (GTTC-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
139	pICSL86955OD- AtRbsc2B-XccXopP- YFP-NOST	pICSL86955OD	AtRbsc2B_prom(GGAG-AATG), XccXopP-1st part (AATG-TTGC), XccXopP-2nd part (TTGC-TTCG), YFP (TTCG-GCTT), NOST (GCTT- CGCT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
140	pICSL86955OD- AtRbsc2B-XccXopP- mCherry-NOST	pICSL86955OD	AtRbsc2B_prom(GG AG-AATG), XccXopP- 1st part (AATG- TTGC), XccXopP-2nd part (TTGC-TTCG), mCherry (TTCG- GCTT), NOST (GCTT- CGCT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
141	pGADT7- XccXopP_NotI_and_Bg I2_dom	pGADT7	XccXopP 1st part (AATG-CCTG), XccXopP 2nd part (CCTG-TAGA), XccXopP 3rd part (TAGA-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
142	pBridge: EV+XccXopP	pBridge	XccXopP_NotI_and_Bgl2_dom (NotI and Bgl2 sites)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
143	pBridge: AtExo70B1+XccXopP	pBridge:XccXopP	AtExo70B1 (EcoRI and Smal sites)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
144	pBridge: EV+PspAvrRps4	pBridge	AvrRps4 (Notl and Bgl2 sites)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
145	pBridge: AtSec15B+PspAvrRps4	pBridge:PspAvrRps 4	AtSec15B (EcoRI and BamHI sites)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
146	pBridge:AtSec15B+Xcc XopP	pBridge:XccXopP	AtSec15B (EcoRI and BamHI sites)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
147	pICH86988:XcvXopQ- YFP	pICH86988	XcvXopQ-part I (AATG-CAAG), XcvXopQ-part II (CAAG-TTCG), YFP (TTCG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml
148	pGBKT7:AtRIN4	pGBKT7	AtRIN4 (AATG-GCTT)	Καναμυκίνη 50 ug/ml

149	pGADT7:AtRIN4	pGADT7	Atrin4 (AATG-GCTT)	Αμπικιλλίνη 100 ug/ml
150	pCambia-FLS2::FLS2- GFP	pCambia	Έτοιμη κατασκευή (FLS2-GFP)	Καναμυκίνη 50 ug/ml

Παράρτημα III

A/A	Πλασμιδιακή κατασκευή	Τελικός φορέας	Αγροβακτήριο	Αντιβιοτικό επιλογής
1	Plasma membrane-RFP (35S)	-	AGL-1	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Αμπικιλλίνη 100 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml
2	Mitochondria marker-RFP (35S)	-	AGL-1	Pιφαμπικίνη 50 ug/ml, Αμπικιλλίνη 100 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml
3	Peroxisome marker-RFP (35S)	-	AGL-1	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Αμπικιλλίνη 100 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml
4	Tonoplast of the central vacuole marker-RFP (35S)	-	AGL-1	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Αμπικιλλίνη 100 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml
5	ER marker-RFP (35S)	-	AGL-1	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Αμπικιλλίνη 100 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml
6	Plastid marker-RFP (35S)	-	AGL-1	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Αμπικιλλίνη 100 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml
7	Golgi marker-RFP (35S)	-	AGL-1	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Αμπικιλλίνη 100 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml
8	Ubi10::mCherry::Atg8A::Alli mCherry	-	GV3101	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Γενταμυκίνη 10 ug/ml, Σπεκτινομυκίνη 50 ug/ml
9	35S:DsRed-FYVE	-	C58C1	Ριφαμπικίνη 50 ug/ml, Καναμυκίνη 50 ug/ml

Παράρτημα IV

Αριθ μός στο κουτ ί	Όνομα εκκινητών	Αλληλουχία (5'>3')	Σκοπός	Anneali ng Tm (Phusio n Pol, NEB)	Προϊ όν PCR (bp)
1	RRS1_WRKY_ FWD	TT GGTCTC TA <u>ATG</u> TCTGACGTA CCAAAAAAGGAG	WRKY ID	62	356
2	RRS1_WRKY_ REV	TT GGTCTC TAAGC <u>TTA</u> CGAACC GCAGATGGAG			
3	AvrRps4c FWD	TGT GGTCTC AAATGGGTAAACG AGTCTATC	AvrRps4 C- terminal	52	295
4	AvrRps4c REV	TGT GGTCTC AAAGC <u>TTA</u> TTGGT TGATTCTGC	effector		
13	Xcc_AvrBs2_F WD	CCGGTCTCAAATGCGTATTGCT CTCTTGCAAACC	XccAvrBs2 ID	65	1019
14	Xcc_AvrBs2_B salelim_REV	TTGGTCTCACGGGACCTGCGAa ACCAA	Eliminate internal Bsal		
15	Xcc_AvrBs2_B salelim_FWD	TTGGTCTCACCCGTTCGCGCAG TTG	site	65	1138
16	Xcc_AvrBs2_R EV	ACAGGTCTCAAAGCTCACTCGC CCGGCTC	XccAvrBs2 ID		
17	Xcc_XopK_FW D	TTGGTCTCAAATGgtcgccaagtat cttgc	XccXopK effector	64	2340
18	Xcc_XopK_RE V	TTGGTCTCAAAGC tca agggctgaatgacgg			
19	Xcc_XopL_FW D	TTGGTCTCAAATGtcagcgggcgg cc	XccXopL effector	70	1515
20	Xcc_XopL_RE V	CAGGTCTCAAAGC cta actctcagaagcgtcagtc			
21	Xcc_XopN_FW D	TTGGTCTCAAATGaaacctgctgca tctgc	XccXopN effector	64	187
22	Xcc_XopN_Bs alelim_REV	TTGGTCTCAtggcgtctgcggtttcct	Eliminate internal Bsal		
23	Xcc_XopN_Bs alelim_FWD	TTGGTCTCAgccactgcggacgcatt	site	70	1977
24	Xcc_XopN_RE V	TTGGTCTCAAAGC <u>tca</u> tgccggttgcggc	XccXopN effector		
25	Xcc_XopP_FW D	TTGGTCTCAAATGcatcgtgtcgaa atgatc	XccXopP effector	66	1328
26	Xcc_XopP_Bsa Ielim_REV	TTGGTCTCAttgctggccgg c ctc	Eliminate internal Bsal		
27	Xcc_XopP_Bsa lelim FWD	TTGGTCTCAgcaagcatcgcaagcc g	site	65	878

49	B3_Bsalelim_F	TT <u>GGTCTC</u> Aaaaaggatttcaacgcc	Eliminate	65	803
	WD	gaca	internal Bsal		
			site		
50	B3_REV	TT <u>GGTCTC</u> AAAGC <u>tta</u> ctgcgaccg	B3 ID		
		cacgatc			
53	CG_FWD	TT <u>GGTCTC</u> AAATGgttgctgcacaa	CG ID	56	185
		at			
54	CG_Bsalelim_	TT <u>GGTCTC</u> Aaaaacctaatga a acct	Eliminate		
	REV	ttt	internal Bsal		
55	CG_Bsalelim_	TT <u>GGTCTC</u> Attttgacatcaacgtgct	site	62	451
	FWD	t			
56	CG REV	TTGGTCTCAAAGCttaagttgagcc	CG ID	-	
	_	gtgatttc			
57	Exo70 FWD	TTGGTCTCAAATGgggtttgagcac	Exo70 ID	62	2013
	_	000 0 0			
58	Exo70 Bsaleli	TTGGTCTCAttagcagatctccgtacc	Eliminate	-	
	m REV	tt 5 5 5	internal Bsal		
59	Exo70 Bsaleli	TTGGTCTCActaagggaagaaggg	site	64	144
	m FWD	at			
60	Exo70 REV	TTGGTCTCAAAGC tta	Exo70 ID		
		cactagtgacggctga			
61	HSF FWD	TTGGTCTCAAATGgccgagaagag	HSF ID	67	705
_		cgcc	_	-	
62	HSF REV	TTGGTCTCAAAGC tta	•		
_		tagcatgtggccgtgccta			
63	Kinase-	TTGGTCTCAAATGgtatccgcaaaa	Kinase-C ID	60	1364
	C FWD	attg			
64	Kinase-	TTGGTCTCAttccagaatagaaacca	Eliminate		
	C Bsalelim1	Cg	internal Bsal		
	REV		site		
65	Kinase-	TTGGTCTCAggaagggatacaagac	•	70	202
	C Bsalelim1 F	tccagcg			
	wd -				
66	Kinase-	TTGGTCTCAAAGC tta	Kinase-C ID		
	C Bsalelim2	cgacgagtaggccgacggctttggat			
	REV				
67	Kinase-N-	TTGGTCTCAAATGgatcgccattca	Kinase	64	1089
_	C010 FWD	actc	N C010 ID	-	
68	Kinase-N-	TTGGTCTCAAAGC tta			
	CO10 REV	ttgtgctggctgcattt			
69	Kinase-N-	TTGGTCTCAAATGgaattcagagtt	Kinase-	63	878
0.5	C153 FWD	tgtacac	N C153 ID		0,0
70	Kinase-N-		Fliminate		
10	C153 Bsaleli	a	internal Bsal		
	m REV	-	site		

71	Kinase-N-	TT <u>GGTCTC</u> Atgcacgtgatataattg		66	82
	C153_Bsaleli	acaggett			
	m_FWD				
72	Kinase-N-	TT <u>GGTCTC</u> AAAGC <u>tta</u>	Kinase-	1	
	C153_REV	ggcgcccatgacgg	N_C153 ID		
73	PP2C_FWD	TT <u>GGTCTC</u> AAATGggcattgagcac	PP2C ID	65	330
		ttgg			
74	PP2C_Bsaleli	TT <u>GGTCTC</u> Atgtcagtggggcctctga	Eliminate	1	
	m_REV	gga	internal Bsal		
75	PP2C_Bsaleli	TT <u>GGTCTC</u> Agacaggctatacggcca	site	66	1143
	m_FWD	gaa			
76	PP2C_REV	TTGGTCTCAAAGC tta	PP2C ID	1	
		cgaccaggccagatcg			
77	TRX_FWD	TT <u>GGTCTC</u> AAATGgacttccagtca	TRX ID	62	145
		tcg			
78	TRX_Bsalelim	TT <u>GGTCTC</u> Aacttgatctctgatgtta	Eliminate 1st	1	
	1_REV	gtct	internal Bsal		
79	TRX_Bsalelim	TT <u>GGTCTC</u> Aaagtgtctcagaacccc	site	64	255
	1_FWD	aaca			
80	TRX_Bsalelim	TT <u>GGTCTC</u> Attggcgag g ccagcaaa	Eliminate 2nd	1	
	2_REV	a	internal Bsal		
81	TRX_Bsalelim	CCGGTCTCAccaacgattttccagat	site	65	71
	2_FWD	gc			
82	TRX_Bsalelim	TT <u>GGTCTC</u> Agatgctcggcaatatac	Eliminate 3rd	1	
	3_REV	ttggt t tc	internal Bsal		
83	TRX_Bsalelim	TT <u>GGTCTC</u> Acatctggaagttgatgg	site	62	132
	3_FWD	t			
84	TRX_REV	TT <u>GGTCTC</u> AAAGC <u>tta</u>	TRX ID]	
		gttgtccataattagggc			
85	WRKY_C_FWD	TT <u>GGTCTC</u> AAATGggcattgtgcac	WRKY_C ID	64	1485
		ttaa			
86	WRKY_C_REV	TT <u>GGTCTC</u> AAAGC <u>tta</u>]		
		gtcagtgtcaggatagcca			
87	ZFBED_N_C04	TT <u>GGTCTC</u> AAATGgaattggaagg	ZFBED_N_C0	64	369
	5_FWD	aggc	45 ID		
88	ZFBED_N_C04	TT <u>GGTCTC</u> AAAGC <u>tta</u>]		
	5_REV	aaccccaacccctctcat			
89	ZFBED_N_C35	TT <u>GGTCTC</u> AAATGgaacctgagac	ZFBED_N_C3	66	330
	0_FWD	actg	50 ID		
90	ZFBED_N_C35	CCGGTCTCAAAGC tta]		
	0_REV	aacaggggcaggagtt			
91	WRKY_RPR1_	TTGGTCTCAAATGcatgtgaggagt	OsWRKYs ID	67	729
	FWD	aatacggag			
92	WRKY_RPR1_	TTGGTCTCAAAGC <u>tca</u> accagtaac]		
	REV	ccaatcacagcc			

99	RsPopP2_FW	ttGGTCTCT <u>AATG</u> AAGGTCAGT	RsPopP2	59	1464
	D	AGCGC	effector		
100	RsPopP2_REV	catGGTCTCA <u>AAGCTTAGTTGGT</u>			
		ATCCAATAGGGA			
101	Xcv_XopS_FW	ttGGTCTCtaATGGGAGATGTAC	XcvXopS	63	927
	D	AAATGGG	effector		
102	Xcv_XopS_RE	ttGGTCTCtaagc <u>TCA</u> AGAAATGC			
	V	CATCGCT			
114	NtRP1aSecP-F	AAGGTCTCG ccAT GGGATTTGT	Secretion	72	98
		TCTCTTTTCACAATTGC	signal of PR1		
115	NtRP1aSecP-R	AAGGTCTCA CATT GAATTTTGG			
		GCACGGCAAGAGTG			
127	ObExo70B1_F	ttGGTCTCtaATGGCGGCGGCGC	ObExo70B1_l	71 (Q5)	1919
	1	С	arge-part1		
128	ObExo70B1_R	ttGGTCTCtTGTACTTTATATACC			
	1	TTGTGGAATTCCTTCCACCC			
129	ObExo70B1_F	ttGGTCTCtTACAACCCTGATGA	ObExo70B1-	64 (Q5)	88
	2	TTTGGAAAATCA A	part2 with		
130	ObExo70B1_R	ttGGTCTCtaagc <u>TCA</u> AGCATTTG	stop codon		
	2_stop	GTCTTCTGC			
131	ObExo70B1_R	aaGGTCTCtcgaaggAGCATTTGG	ObExo70B1-	65 (Q5)	87
	2_tag	TCTTCTGCCTT	part2 w/o		
			stop codon		
162	ObExo70B1_F	ttGGTCTCtCCAGCTCAGCCAAG	ObExo70B1_l	64 (Q5)	2141
	_5'UTR	CG	arge from		
			5'UTR-part1		
			(couple with		
			#130 rev		
			primer)		
202	ObExo70B1_s	ttGGTCTCtaATGCTGCGGGCGG	ObExo70B1_s	72	1214
	mall	GCTA	mall-part1		
			(pair with		
			128)		
136	AtExo70B1_F1	ttGGTCTCtaATGGCGGAGAATG	AtExo70B1-	72 (Q5)	1199
		GTGAAGAGAAGTTACTTGC	part1		
137	AtExo70B1_R	ttGGTCTCtGGAACCGCAGCTTT			
	1	AGCCGGGTC C			
138	AtExo70B1_F2	ttGGTCTCtTTCCGGGCGGTGG C	AtExo70B1-	68 (Q5)	298
		СТС	part2		
139	AtEx070B1_R	ttGGTCTCtCCTAG A TCTCCATCT			
	2	TTGACTTTCTGAACA			
140	AtExo70B1_F3	ttGGTCTCtTAGGATTGCTGTTA	AtExo70B1-	62 (Q5)	444
		GGAGATG	part3 with		
141	AtExo70B1_R	ttGGTCTCtaagc <u>TCA</u> TTTTCTTCC	stop codon		
	3_stop	CGTGGT			

142	AtExo70B1_R	ttGGTCTCtcgaaggTTTTCTTCCC	AtExo70B1-	62 (Q5)	443
	3_tag	GTGGTAGTC	part3 w/o		
			stop codon		
143	AtExo70F1_F1	ttGGTCTCtaATGGCCGCAACAA	AtExo70F1-	66 (Q5)	1223
		CAACCAC	part1		
144	AtExo70F1_R1	ttGGTCTCtAACACCCCCTTGGT			
		TCATTAC			
145	AtExo70F1_F2	ttGGTCTCtTGTTGGAAGCACTG	AtExo70F1-	66 (Q5)	112
		GGTG	part2		
146	AtExo70F1_R2	ttGGTCTCtCCATTTGTCGTCGG			
		C CTCTTTG			
147	AtExo70F1_F3	ttGGTCTCtATGGTGAGGTTCAT	AtExo70F1-	63 (Q5)	783
		CCAATG	part3 with		
148	AtExo70F1_R3	ttGGTCTCtaagc <u>TTA</u> ACTTTTCCT	stop codon		
	_stop	TCTCGGGTGG			
149	AtExo70F1_R3	aaGGTCTCtcgaaggACTTTTCCT	AtExo70F1-	62 (Q5)	782
	_tag	TCTCGGGTGG	part3 w/o		
			stop codon		
172	XccXopP_R2_t	ttGGTCTCtcgaaggCGGGAGGCT	XccXopP w/o	66 (Q5)	899
	ag_correct	GATACAGG	stop codon		
			(in use with		
			#27)		
151	Xoo_XopP1_F	gaGGTCTCtaaTGCCTAAAATTG	XocXopP1	66 (Q5)	2164
		AATCGACCAAGC	with stop		
152	Xoo_XopP1_R	ttGGTCTCtaagcTTATCGCTGCC	codon		
	_stop	CACCAG			
153	Xoo_XopP1_t	aaGGTCTCtcgaaggTCGCTGCCC	XocXopP1	67 (Q5,	2163
	ag	ACCAGC	w/o stop	Phusion)	
			codon		
154	XooXopP2_F	ttGGTCTCtaaTGCCGAGATTTC	XocXopP2	69 (Q5)	2155
		GAGCGAC	with stop		
155	XooXopP2_R_	ttGGTCTCtaagcTTATTGTTGCC	codon		
	stop	CGCCAGCG			
156	XooXopP2_R_	atGGTCTCtcgaaggTTGTTGCCC	XocXopP2	64 (Q5),	2154
	tag	GCCAG	w/o stop	62	
	Ū.		codon	Phusion	
157	RsHlk3_F1	ttGGTCTCtaaTGttgaaaggacgtat	RsHlk3 -part I	65 (Q5)	1377
	_	cgacg		. ,	
158	RsHlk3 R1	ttGGTCTCtATCCACGGA A ACCG			
	_	GCC			
159	RsHlk3 F2	ttGGTCTCtGGATaagcgcaccgac	RsHlk3 -part II	70 (Q5)	800
	_	acg	with stop	/	
160	RsHlk3 R2 st	ttGGTCTCtaagcTTACCCGGAAG	codon		
-	op	CCGGCAG			

161	RsHlk3_R2_ta	gcGGTCTCtcgaaggCCCGGAAG	RsHlk3 -part II	70 (Q5)	799
	g	CCGGCA	w/o stop		
			codon		
173	AcXopP_F	ttGGTCTCtaATGAGCGATGAGA	AcXopP with	69 (Q5)	1952
		CAGCGG	stop codon		
1/4	ACXOPP_R				
4 7 7	ALE . 70D4 A		415 . 7004	72 (05)	1100
1//	ATEXO/UB1_A		ATEXO/UB1-	72 (Q5)	1190
	в_к	GGATCAAATTC	AB truncation		
			(pair with #126)		
170		tteetetetaataATTeetATTee	#150) For	59 (05)	605
1/0			amplifying	JJ (UJ)	005
179			the BC		
1/5		ATAATTCATATGG	domains of		
	e_n		AtExo70B1		
180	AtExo70B1 C	ttGGTCTCtaatgGCTAAAGCTGC	For	68 (Q5)	734
	D F –	GGTTCCG	amplifying		
181	 AtExo70B1_C	ttGGTCTCtaagcTCATTTTCTTCC	the CD		
	D_R	CGTGGTAGTCC	domains of		
	_		AtExo70B1		
209	AtExo70B1_G	ttGGTCTCt CGAG AACACAGACT	AtExo70B1_E	72	1072
	1039A_R	TAAATTCAGGCATCA	347K (pair		
			with #136)		
210	AtExo70B1_G	ttGGTCTCt CTCG GATCAGTTTT	AtExo70B1_E	61	848
	1039A_F	GCTCAGTTC	347K (pair		
			with #141)		
211	ObExo70B1_A	ttGGTCTCt TGAG AACAACCCCT	ObExo70B1_s	69	433
	400G_R	CGAGTTCC	mall K134E	(small)/	(sma
			(pair with	64(large	II) /
			#202) and)	1116
			ODEX0/0B1_1		(larg
			arge_K368E		e)
			(pair with #127)		
212	ObEvo70B1 A	tteetetete	$\frac{\#127}{0}$	61	869
212	400G F	GG	mall K134F	01	809
	4000_1		and		
			ObExo70B1		
			arge K368E		
			(pair with		
			#130 with		
			stop codon		
			and #131 w/o		
			stop codon)		
218	Sec3A_Fwd	ttGGTCTCtaATGGCGAAATCAA	AtSec3A with	60	2667
		GCGCCG	stop codon		

CCAGAAGTCCCCAGAAGTCC222Sec5A_Fwd1ttGGTCTCtATGCGAGCGATA GCATTGAtSec5A-part I572972223Sec5A_Rev1ttGGTCTCCCGGGGTTTCGAC TGGTTAtSec5A-part II58329224Sec5A_Fwd2ttGGTCTCtAGGGCATAATCGT AGACCAACAtSec5A-part II58329225Sec5A_Rev2ttGGTCTCtaagCTTATCTTCGTCT GGGTCGGAtSec6 with stop codon572325226Sec6_FwdttGGTCTCtaagCTTAAGTGAGTT TTCGCCACATAGAtSec6 with stop codon572325228Sec8_Rev1ttGGTCTCtaATGGGGATTTCA ATGGTTGAtSec8-part I stop codon571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtAATGGGGATTTCA ATGGTTGAtSec8-part II with stop codon571604230Sec8_Rev2ttGGTCTCtAGCAGAGGCGCT GAtSec8-part II with stop codon562478231Sec10_RevttGGTCTCtaagCTAATGAGAAA CAAGCAAtSec10 with stop codon562478233Sec10_RevttGGTCTCtaagCTCAGGCCAAGGCC TTGGCCACAtSec15A with stop codon582373235Sec15A_Rev2ttGGTCTCtaaTGCAGCTCAGGCC AAACCAtSec15B with stop codon582364237Sec15B_Fwd1ttGGTCTCTCAGGCCAAGAC AAACCAtSec3BAB with stop codon562478238Sec15B_Rev1ttGGTCTCTCAAGGCGCAAGAAT CTTCAATCCAtSec4BB- part II56341239Exo84B_Fwd2ttGGTCTCTGGCTCGGCAAGAA AAAGCCAtExo84B- part II641757 <th>219</th> <th>Sec3A_Rev</th> <th>ttGGTCTCtaagcTTACATGGAAG</th> <th></th> <th></th> <th></th>	219	Sec3A_Rev	ttGGTCTCtaagcTTACATGGAAG			
222Sec5A_Fwd1ttGGTCTCtAATGTCGAGCGATA GCAATGAtSec5A.part I572972223Sec5A_Rev1ttGGTCTCtCTGGGGTTTCGAC TGCTTTtGGTCTCCCTGGGGCTTCGAC I with stop codonAtSec5A.part I with stop codon58329224Sec5A_Fwd2ttGGTCTCtAGGGCATAATCGT GGGTCGGAtSec5A.part I with stop codon572325225Sec5A_Rev2ttGGTCTCtaagCTTAGTGGAGG ATCTTGGAtSec6 with stop codon572325226Sec6_FwdttGGTCTCtaagCTTAAGTGAGGT TTCGCCACATAGAtSec8-part I stop codon571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtAGCGAGAGCGCTC TGGAGAtSec8-part II with stop codon571604230Sec8_Rev2ttGGTCTCtAGCGAGATGCTGCT GGATTTCCAAAAtSec8-part II with stop codon571604231Sec10_RevttGGTCTCtaagCTCAGCAGAGGAGA TCAGAGCAAGAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagCTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCaagCTCAGTCAAGC TTGGCCACAtSec15A with stop codon582373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagCTCAGCTCAA AAGCCAtSec3B- with stop codon582364237Sec15B_FwdttGGTCTCTCTGCGCCAAGA AAGCCAtExo84B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCTCGAGCTAAGCTTCTT AGGTCTCGGCCAAGAAAtExo84B- part II56341241Exo84B_Fwd2ttGGTCTCTGGCTCGAGCGAGAA AAA			CCAGAAGTCC			
Image: constraint of the section of	222	Sec5A_Fwd1	ttGGTCTCtaATGTCGAGCGATA	AtSec5A-part	57	2972
223Sec5A_Rev1ttGGTCTCtCAGGGGTTTCGAC TGCTTAtSec5A-Pard2ttGGTCTCtCAGGGCATATCGT AGACCAACAtSec5A-Fard2329224Sec5A_Rev2ttGGTCTCtCAGGGCATATCGTC GGGTCGGAtSec5A-Rev2ttGGTCTCtaagCTTATCTTCGTCT GGGTCGGAtSec6 with stop codon572325226Sec6_RevttGGTCTCtaagCTTAAGTGAGGAGT ATCTGGAtSec6 with stop codon572325227Sec6_RevttGGTCTCtaagCTTAAGTGAGTG ATGTTGAtSec8-part I with stop571604228Sec8_Fwd1ttGGTCTCtCAGCGGATTTCA ATGGTTGAtSec8-part I with stop571604230Sec8_Rev1ttGGTCTCtCAGCGAGAGCTGCT GAtSec8-part II with stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtCAGCGAGAGGAGA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon521562233Sec10_FwdttGGTCTCtaagCTGAGTCAGCT AAACCAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaaTGAGAGAGAGAGA AAACCAtSec15A with stop codon552373235Sec15B_FwdttGGTCTCtaagCTCAGTTCAAT CCTTGAGTCTCCodon582364237Sec15B_FwdttGGTCTCtaaGCGCGAAGA AAGGACAtSec3B-B with stop codon641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCTGAATGGCGCGAAGAA CGGCCAtSec3B-B AAGCCAtSec3B-B AAGCCAtSec3B-B AAASC641757240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCTGAGTCTCCAG CGTAATCAtSec3AGB- AAGCCAtSec3B- AAASC64355242Exo			GCAATG	I		
Image: Constraint of the section of	223	Sec5A_Rev1	ttGGTCTCtCCTGGGGTTTCGAC			
224Sec5A_Fwd2ttGGTCTCtCAGGGCATAATCGT AGACCAACAtSec5A-part II with stop codon58329225Sec5A_Rev2ttGGTCTCtaagCTTATCTTCGTCcodon572325226Sec6_FwdttGGTCTCtaaGGGAGTTTCA ATCTTGGAtSec6 with stop codon572325227Sec6_RevttGGTCTCtaaTGGGGAGTTTCA ATGTTGAtSec8-part I stop codon572325228Sec8_Fwd1ttGGTCTCtaATGGGGATTTCA ATGGTTGAtSec8-part I stop codon571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtaATGGGGAGTTTCA ATGGTTGAtSec8-part II with stop571604230Sec8_Rev2ttGGTCTCtaATGAGAGAGCTGCT GAtSec8-part II with stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaaGCAGAGGAGA TCAGAGCAAGAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTcaaGCTAGATGAGAGAGGAC TGGCCACAtSec15A with stop552373233Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGAGAGGCC AAACCAtSec15A with stop582364234Sec15B_FwdttGGTCTcaaGCTCAGCTCAGCT CTGGCCACAtSec15B with stop582364237Sec15B_FwdttGGTCTCTCAATGGCGCGAAGA AAGCCAtExc084B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCTGAGCTCCAGATCCCAG AAGCCAtExc084B- part II56341240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCTGGACGAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Fwd3ttGGTCTCAGGTCTCAATGGCGC CATTGAGCC <td< td=""><td></td><td></td><td>TGCTT</td><td></td><td></td><td></td></td<>			TGCTT			
Image: constraint of the state of the sta	224	Sec5A Fwd2	ttGGTCTCtCAGGGCATAATCGT	AtSec5A-part	58	329
225Sec5A_Rev2ttGGTCTCtaagcTTATCTTCGTCT GGGTCGGcodon232226Sec6_FwdttGGTCCtaATGATGGTCGAAG ATCTTGGAtSec6 with stop codon572325227Sec6_RevttGGTCCtaATGGGGATTTCA ATGGTTTGAtSec8-part I571604228Sec8_Fwd1ttGGTCTCtGATGGGAGCAGCTCC TGGAGAtSec8-part I571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtCAGCGAAGCAGCTCC TGGAGAtSec8-part II with stop521562230Sec8_Rev2ttGGTCTCtGATGACAGAAGAAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaATGACAGAAGAAA GAATTTCCAAAAAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTCtaATGACAGAAGGAAA GAATTTCCAAAAAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaATGACGACAGCAGCA TGGCCACAtSec15A with stop codon552373234Sec15A_RevttGGTCTCtaATGATGAGAGGCC AACCAtSec15B with stop codon582364235Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAGCTCACAT CCTTGAGTCTCAtSec35B with stop codon562373238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtCAAGGCGCAAGAA CGGCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGACTGACTCTCCAG AAGGCCAtExo84B- part II56341240Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGAGCTTGACTGCGC AAAGCCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTGATCTCCAG AAAGCCAt			AGACCAAC	II with stop		
Image: constraint of the state of the sta	225	Sec5A Rev2	ttGGTCTCtaagcTTATCTTCGTCT	codon		
226Sec6_FwdttGGTCTCtaATGATGGTCGAAG ATCTTGGAtsec6 with stop codon572325227Sec6_RevttGGTCTCtaagCTTAAGTGAGTT TTCGCCACATAGAtSec6 with stop codon571604228Sec8_Fwd1ttGGTCTCtaATGGGGATTTTCA ATGGTTTGAtSec8-part I with stop571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtGCGAAGCAGCTCC TGGAGAtSec8-part II with stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaATGACAGAAGGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTCtaATGACAGAAGGAAA GAATTTCCAAAAAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaATGACGACGCTCAGCT CAGAGCAAGAtSec10 with stop codon552373234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGGAGGCC AACCAtSec15A with stop codon582364235Sec15A_RevttGGTCTCtaATGCATCGTCAA CCTTGAGTCTCAtSec15B with stop codon582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaATGCAATCGTCAA CGTCAAtExo84B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtCAATGCGCGCAAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev1ttGGTCTCtGACGTTCTGATCTCCAG AAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG AAGCCAtExo84B- part III with stop codon56351243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG AAGCCAtExo84B- part III with stop codon56351 <td></td> <td>_</td> <td>GGGTCGG</td> <td></td> <td></td> <td></td>		_	GGGTCGG			
ATCTTGGATCTTGGstop codon227Sec6_RevttGGTCTCtaagcTTAAGTGAGTT TTCGCCACATAGAtSec8-part I228Sec8_Fw1ttGGTCTCGGAGGAGTTTCA ATGGTTTGAtSec8-part I571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtGCTGAAGCAGCTCC TGGAGAtSec8-part II521562230Sec8_Rev2ttGGTCTCtCAGCAGAGGCTGCT GAtSec8-part II with stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTCtaaGCTCAGCTCAGCTCAGCT TGGCCACAtSec10 with stop codon602478233Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGGAGGCC AAACCAtSec10 with stop codon552373234Sec15A_RevttGGTCTCtaagCTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon582364235Sec15B_RevttGGTCTCtaaGCTCAGCTCAGCT AAGCCAtSec15B with stop codon582364237Sec15B_Rev1ttGGTCTCtaATGCAGCTCAGCT CTTGAGTCTCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCTCGGCCAGAGCAAAAT CGTACTCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rvd2ttGGTCTCGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCCGGCCAGACAAAAT CATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCGAGCTATAGCTGC CATGAGACTCGCCAtExo84B- part III with stop codon64355	226	Sec6 Fwd	ttGGTCTCtaATGATGGTCGAAG	AtSec6 with	57	2325
227Sec6_RevttGGTCTCtaagCTTAAGTGAGTT TTCGCCACATAGAtSec8-part I571604228Sec8_Fwd1ttGGTCTCtGCTGAAGCAGCTTC TGGAGAtSec8-part I571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtGCTGAAGCAGCTCC TGGAGAtSec8-part II with stop codon521562230Sec8_Rev2ttGGTCTCtAaTGACAGAAGCAGATGCTGCT GAtSec8-part II with stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtAaTGACAGAAGGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTCtaagCTCAGTCAGCTCAGCC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478233Sec15A_RevttGGTCTCtaagCTCAGTCAGCTCAGCC AAACCAtSec15A with stop codon552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagCTCAGTTAATGCAATCG CCTTGAGTCTCAtSec15B with stop582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaagCTCAGTTCAAT CCTTCAATGCCAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaaGCGCGCGAAGA AAGGACAtExo84B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCTCCAAAGGCTCTCTT AGGTCATCGAtExo84B- part II64355241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGGCCGAAGAAAATT AAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTCATTGGGAGGA AAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtagCCAATAGCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355<			ATCTTGG	stop codon		
228Sector_interTTCGCCACATAGAtSec8-part I571604228Sec8_Fwd1ttGGTCTCtaATGGGGATTTTCA ATGGTTTGAtSec8-part I571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtGCTGAAGCAGCTC TGGAGAtSec8-part II with stop521562230Sec8_Fwd2ttGGTCTCtAGCAGAAGCAGCTGCT GAtSec8-part II with stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTCtaagcTCAGCTCAGCC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAGCC TTGGCCACAtSec15A with stop552373234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGAGGCC AAACCAtSec15A with stop552373235Sec15B_FwdttGGTCTCtaagcTCAGTTCAATT CCTTGAGTCTCAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaATGCAGCTCAGCTCACAT CGTACTCAtGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtGACGAGCAAAAAT CGTATCAtExo84B- part II641757240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGGCCAGAGACAAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II64355241Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTCATGGCGCAAtExo84B- part III with stop codon64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtaagCTCAATAGCTCA CATGAGAAtExo84B- part III with stop codon64355	227	Sec6 Rev				
228Sec8_Fwd1HUGGETCTCtaATGGGGATTTTCA ATGGTTTGAtSec8-part I571604229Sec8_Rev1ttGGTCTCtGCTGAAGCAGCTGC TGGAGAtSec8-part II521562230Sec8_Rev2ttGGTCTCtCAGCAGAGATGCTGC Gwith stopwith stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagCTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec15A with stop552373234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGGAGGCC AAACCAtSec15A with stop552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagCTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAGCTCACAT CTTTCCAATCCAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaATGCAGCTCACAT CTTCCAATCCAtSec45B with stop641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtGACAGCAGAAAAT CGTAATCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACGAGCAGAAAAT AAGCCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACTTTGGACAGCAGAAAAT AAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355242Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGAG AAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGCGC 	227	Seco_nev	ττοσογοτασα			
229Secto_nw1ATGGTTTGATGGTTTG229Sec8_Rev1ttGGTCTCtGCTGAAGCAGCTGCT GAtSec8-part II with stop521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtAGCAGAAGAGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon521562232Sec10_FwdttGGTCTCtaaTGACAGAAGGAA GAATTTCCAAAGAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaaTGACAGAAGGAGACC TGGCCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaaTGATGGAGGCC AAACCAtSec15A with stop552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaaTGCAGTCAATC CCTTGAGTCTCAtSec15B with stop582364237Sec15B_FwdttGGTCTCtaaTGCAGCTCACAT CCTTGAGTCTCAtSec15B with stop582364238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGCTCGACTATCCCAG CGTAATCAtExo84B- part I56341241Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part II64355242Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop64355242Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG ACATGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGCCStop codonStop codonStop codon	228	Sec8 Fwd1		AtSec8-nart I	57	1604
229Sec8_Rev1ttGGTCTCtGCTGAAGCAGCTTC TGGAGAtSec8-part II with stop codon521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAAtSec8-part II with stop codon521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon602478232Sec10_FwdttGGTCTCtaagcTCAGCCAAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaagcTCAGTTAAATTT CCTTGAGTCTCCodon552373235Sec15B_FwdttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATTT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CCTTCAATCTCAtSec15B with stop582364237Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAGCGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtGACAGCGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I56341240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAGCCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3 <tt>ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG AAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTATTGGCGAtExo84B- part III with stop codon64355</tt>	220	SCCO_I WOI	ATGGTTIG		57	1004
223Seca_Nev1Iticor Crucic GAAGCAGCTIC TGGAGAtSecApart II with stop codon521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon521562232Sec10_FwdttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAGAAG GAATTTCCAAAAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGGAGGCC ACACCAtSec15A with stop codon552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATTT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaagCTCAGCTCACAT CTTCAATCCAtSec15B with stop codon582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagCTCAGCTCACAT CGTCCCodon641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCTCTGAATGCGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACCAGACAAAAT AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGACTTTGGACTGC AAAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG AAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355	220	Soce Pov1		-		
230Sec8_Fwd2tttGGTCTCtCAGCAGATGCTGCT GAtSec8-part II with stop codon521562231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAcodon2478232Sec10_FwdttGGTCTCtaagCTCAGCAGAGGAA TCAGAGCAAGAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagCTCAGCTCAAGC TGGCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGGAGCC AACCAtSec15A with stop codon552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagCTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaagCTCAGCTCACAT CTTCAATCCAtSec15B with stop codon582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaATGCAGCGCAAGA AAGGACAtExo84B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtGAGCGCAGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACCTGATCTCCAG AAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGACTTTGGACAGACGC AAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGACG AAGCCAtExo84B- part III with stop codon55355	225	Seco_Nevi	TECAE			
230SetS_FW02IteGTCTCLAGCAGATGCTGCTAtSetS_PATTI321352231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagCTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAcodon2478232Sec10_FwdttGGTCTCtaATGACAGAAGGAA ACATTGACAAGAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagCTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGGAGGCC AAACCAtSec15A with stop552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagCTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATGCTGAA AAGGACAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaATGCAGCGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtGACTGCAGCGCGAAGAA CGGCCAtExo84B- part I641757240Exo84B_Rev1ttGGTCTCtGACTCGACACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACTCGACACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGACTCTGATCCCAG AAAGCCAtExo84B- part III with stop64355243Exo84B_Fw3ttGGTCTCtGACTCTAATGCTGC CATTGAGGAtExo84B- part III with64355	220	Soce Enda		AtSoc9 part II	E 2	1562
231Sec8_Rev2ttGGTCTCtaagcTTAATGAGAAA GAATTTCCAAAcodon232Sec10_FwdttGGTCTCtaATGACAGAAGGGAA TCAGAGCAAGAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGAGGGCC AAACCAtSec15A with stop552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCGA AAGGACAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaATGCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtGACGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtGACAGACAAAATT CGTATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACTGAGCTCCCAG AAGGCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG AAAGCCAtExo84B- part II with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTAGGTGC AAAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355	250	Seco_rwuz		Alseco-part if	52	1202
231Sec8_ReV2IttGGTCTCtaggTTAATGAGAAACoddit232Sec10_FwdttGGTCTCtaATGACAGAAGGAAAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGCStop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGAGGCCAtSec15A552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaagcTCAGTCAGCT CCTTGAGCCAtSec15B582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagCTCAGCTCACAT CTTCCAATCCcodon552373238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGCGGCGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part 1641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTATCAtExo84B- part 156341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part 1I64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTCAATGGCGGATGA AAAGCCAtExo84B- part 1I64355243Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part 1II with64355	221	See Devil		sodon		
232Sec10_FwdttGGTCTCtaATGACAGAAGGAA TCAGAGCAAGAtSec10 with stop codon602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec10 with stop codon602478234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGGAGGCC AAACCAtSec15A with stop552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaaGCTCAGCTCACAT AAGGACAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCCAtExo84B- part I641757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtTCAATGGCGCGAAGA AGGTCGTCTGAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtGACGAGCAAAAAT AGGTCGTCTGAtExo84B- part I56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTAATAGCTGC AAAGCCAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCGAGCTCAATAGCTGCAtExo84B- part III with stop codon64355	231	Seco_Revz		COUDII		
232Sec10_FWdttGGTCTCtaATGACAGAAGGAAAtSec10 with602478233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGCstop codon552373234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGGAGGCCAtSec15A552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATTcodon582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaagcTCAGCTCACTAAGGACwith stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACATcodon582364238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGAAtExo84B- part I641757239Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGGACGACAGACAAAAT CGTACTCAtExo84B- part I56341241Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGATCTCCAG AAGCCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGATCTCCAG AAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGATCTCAGT ACATTGAGGAtExo84B- part III with64355	222		GATTICCAA		60	2470
233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGC TTGGCCACstop codon234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGGGCC AAACCAtSec15A552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodoncodon237236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCAA AAGGACAtSec15B with stop codon582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCAtSec15B with stop codon582364238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGCGGCGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtGGCAGAGACAAAAT CGTATCAtExo84B- part I56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGAGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG AAAGCCAtExo84B- part II with64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGAGCTTGGCAtExo84B- part III with64355	232	Seci0_Fwd	TEACACEAAGAAGGAA	AtSec10 with	60	2478
233Sec10_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGC TTGGCCACAtSec15A with stop codon552373234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGAGAGGCC AAACCAtSec15A with stop codon552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon236582364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CCTTGAGTCTAtSec15B with stop codon582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon1757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtGGCGCGAGAAAAT CGTATCAtExo84B- part I56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGAGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II56341242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCStop codon56355			ICAGAGCAAG	stop codon		
234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGGAGGCC AAACCAtSec15A552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCGA AAGGACAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGCGGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part I56341240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGGCCAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGGCCTCGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCAtExo84B- part III with64355	233	Sec10_Rev	ttGGTCTCtaagcTCAGCTCAAGC			
234Sec15A_FwdcacGGTCTCtaATGATGGAGGCCAtSec15A552373235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodoncodon2364236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCGA AAGGACAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon2364238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGCGGCGAAGA CTTCCAATCTCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtGGCC CGGCCttGGTCTCtGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part I56341240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCStop codonStop codonStop codon			TTGGCCAC			
AAACCwith stop235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCGA AAGGACAtSec15B with stop58237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGCGGCGCAAGA CGGCCAtExo84B- part I239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part I240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGGCCGAGAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGACTCTGATCTCCAG AAGCCAtExo84B- part II242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCAtExo84B- part III with	234	Sec15A_Fwd	cacGGTCTCtaATGATGGAGGCC	AtSec15A	55	2373
235Sec15A_RevttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT CCTTGAGTCTCcodon236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCGA AAGGACAtSec15B582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodoncodon1757238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTCTCTGATCCTGAtExo84B- part I64341240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGGCCCAGAGAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II56355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCAtExo84B- part III with stop codon64355			AAACC	with stop		
CCTTGAGTCTCCCTTGAGTCTC236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCGA AAGGACAtSec15B with stop582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon11238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGAdExo84B- part I641757240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGagCTCAATAGCTGC ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355	235	Sec15A_Rev	ttGGTCTCtaagcTCAGTTAAATT	codon		
236Sec15B_FwdttGGTCTCtaATGCAATCGTCGAAtSec15B582364237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon11238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGAtExo84B- part I641757240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCAGG AAAGCCAtExo84B- part II64355242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355			CCTTGAGTCTC			
AAGGACwith stop237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodon238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGAdExo84B- part I240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCAtExo84B- part III with stop codon	236	Sec15B_Fwd	ttGGTCTCtaATGCAATCGTCGA	AtSec15B	58	2364
237Sec15B_RevttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT CTTTCAATCTCcodonI238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGAdExo84B- part I641757240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAtExo84B- part II56341242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtCaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCAtExo80064355			AAGGAC	with stop		
CTTTCAATCTCImage: CTTTCAATCTC238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part l641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGAGGTCGTCTGImage: CGTAATCImage: CGTAATCImage: CGTAATC240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCCImage: CGTAATCImage: CGTAATCImage: CGTAATC242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCStop codonImage: CGTAGCImage: CGTAATCC	237	Sec15B_Rev	ttGGTCTCtaagcTCAGCTCACAT	codon		
238Exo84B_Fwd1ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA CGGCCAtExo84B- part I641757239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGAGGTCGTCTG11240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAAAGCC11242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGagCTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCAtExo8AB- part III with64355			CTTTCAATCTC			
CGGCCpart I239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGh240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCCh242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCh	238	Exo84B_Fwd1	ttGGTCTCtaATGGCGGCGAAGA	AtExo84B-	64	1757
239Exo84B_Rev1ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT AGGTCGTCTGAGGTCGTCTG240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCCAAAGCC242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with stop codon64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCstop codon			CGGCC	part I		
AGGTCGTCTGAGGTCGTCTG240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCC242Exo84B_Fwd3ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG ACATTGAGGAtExo84B- part III with part III with64355243Exo84B_Rev3ttGGTCTCtGagCTCAATAGCTGC CATGAGATCTCGCStop codon	239	Exo84B_Rev1	ttGGTCTCtTCCAAAGGTCTTCTT			
240Exo84B_Fwd2ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT CGTAATCAtExo84B- part II56341241Exo84B_Rev2ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCC			AGGTCGTCTG			
241 Exo84B_Rev2 ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCC part II in the second part III in t	240	Exo84B_Fwd2	ttGGTCTCtTGGACAGACAAAAT	AtExo84B-	56	341
241 Exo84B_Rev2 ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG AAAGCC 242 Exo84B_Fwd3 ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG AtExo84B- 64 355 243 Exo84B_Rev3 ttGGTCTCtGagcTCAATAGCTGC stop codon 55		_	CGTAATC	part II		
AAAGCC AAAGCC 242 Exo84B_Fwd3 ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG AtExo84B- 64 355 ACATTGAGG part III with ACATTGAGGTCCCATAGCTGC stop codon Image: CatGAGATCTCGC 243 Exo84B_Rev3 ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC stop codon Image: CatGAGATCTCGC	241	Exo84B Rev2	ttGGTCTCtGCTCTGATCTCCAG			
242 Exo84B_Fwd3 ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG AtExo84B- 64 355 243 Exo84B_Rev3 ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC stop codon 4 4		_	AAAGCC			
ACATTGAGG part III with 243 Exo84B_Rev3 ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC stop codon CATGAGATCTCGC	242	Exo84B Fwd3	ttGGTCTCtGAGCTTTTGGGATG	AtExo84B-	64	355
243 Exo84B_Rev3 ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC stop codon			ACATTGAGG	part III with	-	
	243	Exo84B Rev3	ttGGTCTCtaagcTCAATAGCTGC	stop codon		
			CATGAGATCTCGC			

244	Exo84C_Rev	ttGGTCTCtaATGGAGAGCAGCG AGGAAG	AtExo84C with stop	58	2310 bp
245	Exo84C_Fwd	ttGGTCTCtaagcTCAAGACTCAG AATCGGTGA	codon		- 1-
264	AtExo70A1_sp lice form1_Fwd1	ttGGTCTCtaATGGCTGTTGATA GCAGAATG	For amplifying the AtExo70A1 CDS (spliceoform 1) (Use with #265 and #267)	61 (with both REV primers)	522 (splc 1)/6 00 (splc 3)
265	AtExo70A1_sp lice form1_Rev1	ttGGTCTCtTGAGGATGGCCTCA GTGAGTTG	Eliminate the endogenous Bsal site		
266	AtExo70A1_sp lice form1_Fwd2	ttGGTCTCtCTCAGACGGGGATG GAGGT		65	1399
267	AtExo70A1_sp lice form1_Rev2	ttGGTCTCtaagc <u>TTA</u> CCGGCGTG GTTCATTCAT	For amplifying the AtExo70A1 CDS (spliceoform 1 and 3)		
268	AtExo70A1_sp lice form2_Fwd1	ttGGTCTCtaATGAGCAACAAAA GCTTTAAGAG	For amplifying the AtExo70A1 CDS (spliceoform 2) (use with #267)	61	1572
269	XopP_C108A_ R1	ttGGTCTCtCAGGGCG T CCGCCA G	Domesticatio n of XccXopP NotI restriction site-part I (use with #25)	62	134
270	XopP_C108A_ F2 XopP_G300A	ttGGTCTCtCCTGCTAAGCAGTC GCCG ttGGTCTCtTCTAAAGATTTTGG	Domesticatio n of XccXopP Bgl2	61	216
	R2	ссттдста	restriction site-part II		
			(use with		
-----	-------------------	-------------------------	---------------------------------------	----	------
272	Verb C2004		#271)	62	1010
272	F3	GCAGTAAC	n of XccXonP	02	1919
	15	GEAGTARE	with Notl and		
			Bgl2-part III		
			(use with		
			#28)		
273	XopP_NotI_F	aaGCGGCCGCaATGCATCGTGT	ХссХорР	58	2202
	wd	CGAAATG	Notl/Bgl2		
274	XopP_Bgl2_Re	tttAGATCT TTA	sites for		
	v	CGGGAGGCTGATAC	cloning in		
			pBridge		
			vector (use		
275			WITH $#274$	57	1075
275	ORL Ewd	GGTG	FcoRI/Smal	57	10/3
276	AtExo70B1 S		sites for		
270	mal Rev	TTTTCTTCCCGTGG	cloning in		
			pBridge		
			vector (use		
			with #276)		
278	XcvXopQ_Fwd	ttGGTCTCtaATGCAGCCCACCG	XcvXopQ-	61	839
	1	CAATC	partl		
279	XcvXopQ_Rev	ttGGTCTCtGTTGCACaAGACCA			
200	1 VeuVenO Fuid		Yau Wara O	67	500
280		CG	nartll w/o	67	598
281			stop codon		
201	2_tag	GTTGCC			
282	XcvXopQ_Rev	ttGGTCTCtAAGCTCAGCGCCCG	XcvXopQ-	64	598
	2_stop	CGTT	partll with		
			stop codon		
283	Sec3A_Rev_ta	ttGGTCTCtCGAAggCATGGAAG	AtSec3A w/o	63	2686
	g	CCAGAAGTCCTC	stop codon		
			(use with		
204	6 40 D i		#218)		2500
284	Sec10_Rev_ta	ttGGTCTCtCGAAggGCTCAAGC	AtSec10 w/o	63	2500
	g	IIGGLCALAAG	stop codon		
			(use with		
285	Sec15B Rov +		$\frac{\#232}{\Delta t Sec 15 R w/c}$	59	2286
205	ag	CTTTCAATCTCT	ston codon		2000
	ч <u>б</u>		(use with		
			#236)		
286	Exo84B_Rev3	ttGGTCTCtCGAAggATAGCTGC	, AtExo84B	64	404
	tag	CATGAGATCTCGC	w/o stop		

			codon (use		
292	RGH2_FWD	ttGGTCTCtaATGGAGATGATGG	HvvRGH2 NIR	61	4946
		AGGCAC	w/o stop		10 10
293	RGH2_REV_ta	ttGGTCTCtCGAAggCACTAGTG	codon		
	g	ACGGCTGATTTC			
294	RGH3_FWD	ttGGTCTCtaATGGTGTCGCCGG	HvvRGH3 NLR	64	3079
		CG	w/o stop		
295	RGH3_REV_ta	ttGGTCTCtCGAAggGCATCTTG	codon		
	g	CTGAAGTGGCTAC			
315	RGH3_Rev1	ttGGTCTCtACGCGTGCATGATA	To check of	65	1569
		CCATGA	there is		
			Indeed a		
			ston codon in		
			RGH3 (from		
			what I		
			already		
			, sequenced)		
			(use with		
			#294)		
316	RGH3_Fwd2	ttGGTCTCtGCGTTCATGTTGCA	To check of	61	1530
		CAAG	there is		
			indeed a		
			premature		
			stop codon in		
			RGH3 (from		
			what I		
			aiready		
			(uso with		
			(USE WILL) #295)		
304	Sec15B EcoBl		AtSec15B	61	2435
	F	AAAGGAC	EcoRI/Smal	01	2.00
305	Sec15B Smal	attCCCGGGTCAGCTCACATCTT	sites for		
	R	ТСААТСТС	cloning in		
			pBridge		
			vector (use		
			with #305)		
341	Sec15B_BamH	aatggatccTCAGCTCACATCTTTC	AtSec15B	61	2435
	I_Rev	AATCTC	EcoRI/BamHI		
			sites for		
			cloning in		
			IVICS I OT		
			pBridge (use		
			with 317)		

306	RFP_Fwd	ttGGTCTCtaATGAGCGAGCTTA	RFP with	59	721
		TCAAAG	AATG-TTCG		
307	RFP_Rev	aaGGTCTCtCGAAggTCTGTGTC	ends (for		
		CGAGCTTAGA	PR1-RFP-GFP		
			construct in		
			pICH86966)		
308	AvrRps4_REV	ttGGTCTCtCGAAggTTGGTTGA	AvrRps4c w/o	57	293
	_tag	TTCTGCGG	stop codon		
			(use with #3)		
309	XopP-100-Fwd	ttGGTCTCtaatgATCTTTAGAGA	XopP -100aa	63	1902
		TGTGATCGGCAG	with stop		/960
			codon (in use		
			with #28 and		
			#207)		
310	Chp7_Fwd1	ttGGTCTCtaaTGCTTACAGGATC	CmChp-7	58	570
		TGGA	effector-part		
311	Chp7_Rev1	ttGGTCTCtGAACCTGGCAAGCC	1		
		AC			
312	Chp7_Fwd2	ttGGTCTCtGTTCAGGAGATGAA	CmChp-7	55	105
		ACC	effector-part		
313	Chp7_Rev2_st	ttGGTCTCtaagcCTACGTTGCTA	II with stop		
	ор	GGACG	codon		
314	Chp7_Rev2_ta	ttGGTCTCtCGAAggCGTTGCTA	CmChp-7	54	652
	g	GGACGT	effector-part		
			ll w/o stop		
			codon		
319	AtTN2_Fwd	ttGGTCTCTaATGTATTCATCATC	AtTN2 with	59	1249
		GTCTTCTT	stop codon		
320	AtTN2_Rev_ta	ttGGTCTCtCGAAggAGAAGATT			
	g	CAGTCCCGGA			
321	AtTN2_Rev_st	ttGGTCTCtaagcTCAAGAAGATT	AtTN2 w/o	59	1250
	ор	CAGTCCCG	stop codon		
322	BnTn2_Fwd1	ttGGTCTCtaATGTTTTCACCGTC	BnTN2-part I	60	1060
		ТТСТТС			
323	BnTn2_Rev1	ttGGTCTCtGTTATTGAGGCCAT			
		CACTTG			
324	BnTn2_Fwd2	ttGGTCTCtTAACCAGCTTGGGA	BnTN2-part II	61	532
		TTGATG			
325	BnTn2_Rev2	ttGGTCTCtTCTAAAAGCGGACT			
		GACGAA			
326	BnTn2_Fwd3	ttGGTCTCtTAGAGAGAGGGAC	BnTN2-part III	56	109
		CTTTATG	w/o stop		
327	BnTn2_Rev3_t	ttGGTCTCtCGAAggAGAATCAT	codon		
	ag	AAACAGAGTTACC			

328	BnTn2_Rev3_	ttGGTCTCtaagcTCAAGAATCAT	BnTN2-part III	56	110
	stop	AAACAGAGTT	with stop		
			codon		
330	AvrRps4c_Not	aaGCGGCCGCaATGGGTAAACG	AvrRps4-c	56	290
	I_Fwd	AGTCTATC	Terminal		
331	AvrRps4c_Bgl	tttAGATCT	Notl/Bgl2		
	2_Rev	TTATTGGTTGATTCTGCG	sites for		
			pBridge in		
			MCS II		
334	Sec5A_Rev_ta	ttGGTCTCtCGAAggTCTTCGTCT	AtSec5A w/o	61	326
	g	GGGTCGG	stop codon		
			(In use with		
			#224)		
335	Sec6_Rev_tag	ttGGTCTCtCGAAggAGTGAGTT	AtSec6 w/o	57	2281
		TICGCCAC	stop codon		
			(In use with		
226			#226)	50	4502
336	Sec8_Rev_tag		AtSec8 W/O	58	1583
		GAATTICCAAAAGGC	stop codon		
227	VonD C1722A	tegeggattegeaca	#230) VccVonD	50	17/1
557	OD Pov		domosticatio	59	1/41
	_OP_Nev		n for BamHI		
			for pBridge		
			vector (In use		
			with #273)		
338	XonP G1722A	gtgtgcgaatccgcga	XccXopP	58	497
000	OP Fwd	2.2.2.2.2.2.2.2.2.	domesticatio		137
			n for BamHI		
			for pBridge		
			vector (In use		
			with #274)		
342	AtRIN4 Fwd	ttGGTCTCtaATGGCACGTTCGA	AtRin4 splice	61	659
	—	ATGTAC	variant 1 with		
343	AtRIN4 Rev s	ttGGTCTCtaagcTCATTTTCCTCC	stop codon		
	top – –	AAAGCCAA			
344	AtRin4_Rev_t	ttGGTCTCtCGAAggTTTTCCTCC	AtRin4 splice	60	661
	ag	AAAGCCAAAG	variant 1 w/o		
	_		stop codon		
Com	N. Actin Fwd	GGAGATGATGCTCCAAGAGC	Control of	54 (Taq	300
mon			quality of	Pol)	
box			gDNA		
Com	N. Actin Rev	CGATTAGCCTTTGGGTTAAGAG	extraction		
mon		G			
box					

103	yADH2_term_ REV	AGA CTT GAC CAA ACC	For sequencing reads of pGADT7 vector	
104	Gal4_DBD_F WD	AGA GTA GTA ACA AAG GTC	For sequencing reads of pGBKT7 vector	
105	Ocs_term_RE V	TAG GCT TCT CGC ATA TCT CA	For sequencing reads of pICH86988 vector	
116	XopK_Read_F WD	TACCAGCACTTCTTGAGC	For reading the GG constructs	
117	XopN_Read_F WD	GCGCACGACCGGCAATGG	For reading the GG constructs	
118	XopP_Read_F WD	GCGGCGTTTTCGGCGCTG	For reading the GG constructs	
119	XopX1_Read_ FWD	CGTCCATGCGACAGCAGG	For reading the GG constructs	
120	Exo70_Read_ FWD	CGTCGGAGGTTAGACAGG	For reading the GG constructs	
121	Calmodulin_R ead_FWD	TGCAAAATGGGCTGCTGG	For reading the GG constructs	
122	XopX2_Read_ FWD	ACAACACGGCGCGCCTGG	For reading the GG constructs	
123	XopZ_Read_F WD5235	ctcagcgtcgctgcgggc	For reading the GG constructs	
124	XopZ_Read_F WD2623	atgcagtgtcggcggcga	For reading the GG constructs	
125	XopZ_Read_F WD3463	cgttcgggaccgaggccc	For reading the GG constructs	

126	XopZ_Read_F WD4333	gcgcccaggagcttcagc	For reading the GG	
164	AtExo70B1_R ead1950_F	gtaggagagagtttctgg	For sequencing the plasmid pGBKT7::AtEx o70B1	
165	AtExo70F1_Re ad1950_F	ggtgtgatctttgggttg	For sequencing the plasmid pGBKT7::AtEx o70F1	
166	XocXopP1_Re ad2649_F	tttgccagcgcatcaggt	For sequencing the plasmid pGADT7::Xoc XopP1	
167	XocXopP2_Re ad2650_F	tatcaagtcgccgatgac	For sequencing the plasmid pGADT7::Xoc XopP2	
182	AcXopP_Read 2650	acgtgctcccatctcccc	For sequencing the AcXopP (2650-3300 bp)	
183	XcvXopP1_Re ad2651	ggttgcaggtgtcgcggcg	For sequencing the XcvXopF1 (2651-3360 bp)	
184	plCH86966_R ead_F1	ttctgagcgggactctgg	For sequencing pICH86966 plasmids	
185	AtAct2_Read_ 540	gctgtcatgtaacacgcg	For sequencing pICH86966 plasmids	
186	XccXopP_Rea d1850	cctccgaccacgacaatg	For sequencing pICH86966 plasmids	
187	pICH86966_R ead_REV	cctgtcaaacactgatag	For sequencing	

			pICH86966	
			plasmids	
188	AtRbsS2b Rea	tatggagttttctgccac	For	
	d 524		sequencing	
	_		pICH86966	
			plasmids	
189	XccXopP Rea	ttgttgacgcttctcgga	For	
	d 512		sequencing	
	_		pICH86988	
			plasmids	
190	AtExo70B2_R	actaagtatggaggaagt	For	
	ead1949F		sequencing	
			pGBKT7::AtEx	
			o70B2	
			plasmid	
200	AtExo70F1_Re	gttcctttagacgctgag	For	
	ad8281F		sequencing	
			AtExo70F1	
201	ObExo70B1_R	tggcgtcgacaagatgag	For	
	ead2050F		sequencing	
			ObExo70B1	
246	Sec3AB_Read	GAAAGAACTAGTCTCTCAG	For	
	1301		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec3	
			A &	
			pBSK::AtSec3	
			B (from 1301	
			bp)	
247	Sec3AB_Read	AGCTGAAGAGGCCTGACC	For	
	1954		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec3	
			A &	
			pBSK::AtSec3	
			B (from 1954	
			bp)	
248	Sec5A-	AGACATTGAGATTAATCAC	For .	
	1_Read1303		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec5	
			A-partl (from	
			1303 bp)	
249	Sec5A-	LAAGICIGGAAAACACIG	For	
	т_кеад1927		sequencing	
			pBSK::AtSec5	

			A-partl (from 1957 bp)	
250	Sec5A-	GCTGTCGTTGCACTGAG	For	
	1 Read2613		sequencing	
	_		the	
			pBSK::AtSec5	
			A-partl (from	
			2613 bp)	
251	Sec6 Read12	GTTTCCAACTATTACAAAC	For	
	78		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec6	
			(from 1278	
			bp)	
252	Sec6_Read19	TTGGGTGGTAGAGTACC	For	
	31		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec6	
			(from 1931	
			bp)	
253	Sec8-	TCTGAGCTAACTAAGTTG	For	
	1_Read1266		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec8-	
			partl (from	
			1266 bp)	
254	Sec8-	CTTGTGAAGTATGTTCAG	For .	
	2_Read1273		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec8-	
			partil (from	
255	Socia Roadi	TTCAACCCCACCCACC	IZ/S DP)	
233	275	TICAACUUCAUUCAUU	sequencing	
	213		the	
			nBSK···AtSec1	
			0 (from 1275	
			bn)	
256	Sec10 Read1	TAGCAGTTGCATATGAG	For	
230	933		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec1	
			0 (from 1933	
			bp)	
257	Sec15A Read	TCAAGACTCACATTGAG	For	
	1277		sequencing	
			the	

			pBSK::AtSec1	
			5A (from	
			1277 bp)	
258	Sec15A Read		Eor	
230	1917		sequencing	
	1017		the	
			PBSKALSELI	
			5A (110111 1017 hr)	
250	CoolED Dood	CACAATACCATTCCCCC	1917 UP)	
259	Secise_Reau	GAGAATAGGATTCCGGC	FOI	
	1278		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec1	
			5B (from	
			1278 bp)	
260	Sec15B_Read	TCGAAGTATTAAGCAAGC	For	
	1921		sequencing	
			the	
			pBSK::AtSec1	
			5B (from	
			1921 bp)	
261	Exo84B-	TTGAATTTTGAGGACAACG	For	
	1_Read1281		sequencing	
			the	
			pBSK::AtExo8	
			4B-partl	
			(from 1281	
			bp)	
262	Exo84C_Read	ACCCTCGATTTGTGTAG	For	
	1283		sequencing	
			the	
			pBSK::AtExo8	
			4C (from	
			1283 bp)	
263	Exo84C_Read	TCGATTCATGCAAATTGTG	For	
	1895		sequencing	
			the	
			pBSK::AtExo8	
			4C (from	
			1895 bp)	
277	Sec8 Read33	ttattggagagcttttgg	For	
-	31		sequencing	
			the	
			pGADT7::AtS	
			ec8 (from	
			3331 bp)	

329	yADH1_term_ rev	aaaatcataaatcataag	For sequencing pBridge plasmids (MCS I, in the end)	
296	RGH3_Read83 50	ggctgcagctcaggctc	For sequencing RGH3	
297	RGH3_Read92 48	atcagcaatgccatggg	For sequencing RGH3	
298	RGH3_Read10 159	ctaagctaagcatttcg	For sequencing RGH3	
299	RGH2_Read83 59	tgttggaactagtgggg	For sequencing RGH2	
300	RGH2_Read93 59	tcggctggctctccactt	For sequencing RGH2	
301	RGH2_Read10 260	tgttaggaaggtgtcaag	For sequencing RGH2	
302	RGH2_Read11 260	gatcttgccttacaacat	For sequencing RGH2	
303	RGH2_Read12 160	gaacaacctgtggtacat	For sequencing RGH2	

Δημοσιεύσεις

1 **RESEARCH ARTICLE**

3 The host exocyst complex is targeted by a conserved 4 bacterial type-III effector that promotes virulence

Vassiliki A. Michalopoulou^{1,2}, Glykeria Mermigka², Konstantinos Kotsaridis¹,
 Andriani Mentzelopoulou¹, Patrick H. N. Celie⁴, Panagiotis N. Moschou^{1,2,3},
 Jonathan D.G. Jones⁵, Panagiotis F. Sarris^{1,2,6}*

9

5

¹Department of Biology, University of Crete, 714 09 Heraklion, Crete, Greece

- ²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and
 Technology-Hellas, Heraklion, 70013, Crete, Greece
- ³Department of Plant Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala
 BioCenter, Linnean Center for Plant Biology, P.O. Box 7080, S-75007 Uppsala,
 Sweden
- ⁴Division of Biochemistry, the Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands
- ⁵The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom
- ⁶Biosciences, University of Exeter, Exeter, United Kingdom
- 20
- *Corresponding author: Panagiotis F. Sarris <u>p.sarris@imbb.forth.gr</u>; <u>p.sarris@uoc.gr</u>
 22
- 23
- 24 Short title: Hijacking the host exocyst complex
- 25

26 **One-sentence summary:** XopP, a core bacterial effector of *Xanthomonas* 27 *campestris* manipulates the plant exocyst complex bypassing several host defense 28 responses.

29

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Professor Panagiotis F. Sarris (p.sarris@imbb.forth.gr; p.sarris@uoc.gr).

34

35 ABSTRACT

For most Gram-negative bacteria, pathogenicity largely depends on the type-III 36 secretion system that delivers virulence effectors into eukaryotic host cells. The 37 38 subcellular targets for the majority of these effectors remain unknown. Xanthomonas campestris, the causal agent of black rot disease of crucifers such as Brassica spp., 39 radish, and turnip, delivers XopP, a highly conserved core-effector protein produced 40 by X. campestris, that is essential for virulence. Here, we show that XopP inhibits the 41 42 function of the host-plant exocyst complex by direct targeting of Exo70B, a subunit of 43 the exocyst complex, which plays a significant role in plant immunity. XopP interferes with exocyst-dependent exocytosis, and can do this without activating a plant NLR 44 (NOD-like receptor) that protects Exo70B in Arabidopsis. In this way, Xanthomonas 45 46 efficiently inhibits the host's pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered 47 immunity (PTI) by blocking exocytosis of pathogenesis-related protein-1A (PR1a), 48 callose deposition and localization of the FLS2 immune receptor to the plasma 49 membrane, thus promoting successful infection. Inhibition of exocyst function without 50 activating the related defences represents an effective virulence strategy, indicating 51 the ability of pathogens to adapt to host defenses by avoiding host immunity 52 responses.

RESEARCH ARTICLE

Intraspecific diversification of the crop wild relative *Brassica cretica* Lam. using demographic model selection

Antonios Kioukis^{3†}, Vassiliki A. Michalopoulou¹⁺, Laura Briers², Stergios Pirintsos^{4,5}, David J. Studholme^{2*}, Pavlos Pavlidis³ and Panagiotis F. Sarris^{1,2,4*}

Abstract

Background: Crop wild relatives (CWRs) contain genetic diversity, representing an invaluable resource for crop improvement. Many of their traits have the potential to help crops to adapt to changing conditions that they experience due to climate change. An impressive global effort for the conservation of various CWR will facilitate their use in crop breeding for food security.

The genus *Brassica* is listed in Annex I of the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. *Brassica oleracea* (or wild cabbage), a species native to southern and western Europe, has become established as an important human food crop plant because of its large reserves stored over the winter in its leaves.

Brassica cretica Lam. (*Bc*) is a CWR in the brassica group and *B. cretica* subsp. *nivea* (*Bcn*) has been suggested as a separate subspecies. The species *Bc* has been proposed as a potential gene donor to brassica crops, including broccoli, cabbage, cauliflower, oilseed rape, etc.

Results: We sequenced genomes of four *Bc* individuals, including two *Bcn* and two *Bc*. Demographic analysis based on our whole-genome sequence data suggests that populations of *Bc* are not isolated. Classification of the *Bc* into distinct subspecies is not supported by the data. Using only the non-coding part of the data (thus, the parts of the genome that has evolved nearly neutrally), we find the gene flow between different *Bc* population is recent and its genomic diversity is high.

Conclusions: Despite predictions on the disruptive effect of gene flow in adaptation, when selection is not strong enough to prevent the loss of locally adapted alleles, studies show that gene flow can promote adaptation, that local adaptations can be maintained despite high gene flow, and that genetic architecture plays a fundamental role in the origin and maintenance of local adaptation with gene flow. Thus, in the genomic era it is important to link the selected demographic models with the underlying processes of genomic variation because, if this variation is largely selectively neutral, we cannot assume that a diverse population of crop wild relatives will necessarily exhibit the wide-ranging adaptive diversity required for further crop improvement.

Keywords: Brassica cretica Lam., Brassica oleracea, Crop wild relatives, Draft genome, de novo sequencing

* Correspondence: DJ.Studholme@exeter.ac.uk; p.sarris@imbb.forth.gr; p.sarris2@exeter.ac.uk

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas, Heraklion, 70013 Crete, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.





 $^{^{\}dagger}\mbox{Antonis}$ Kioukis and Vassiliki A. Michalopoulou contributed equally to this work.

²Biosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Exeter, Exeter, UK



Draft Genome Sequences of Pathotype Strains for Three Pathovars Belonging to Three *Xanthomonas* Species

Microbiology

Resource Announcements

Vassiliki A. Michalopoulou,^a Joana G. Vicente,^b ^(b)David J. Studholme,^c Panagiotis F. Sarris^{a,c}

^aInstitute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology–Hellas, Heraklion, Crete, Greece

^bSchool of Life Sciences, Warwick Crop Centre, University of Warwick, Warwick, Wellesbourne, United Kingdom ^cBiosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Exeter, Exeter, United Kingdom

ABSTRACT We present here the draft genome sequences of type/pathotype strains for three *Xanthomonas* species and pathovars with different host specificities, the *Hedera helix* L. pathogen *Xanthomonas hortorum* pv. *hederae* WHRI 7744 (NCPPB 939T), the rice pathogen *X. oryzae* pv. *oryzicola* WHRI 5234 (NCPPB 1585), and the cotton pathogen *X. citri* subsp. *malvacearum* WHRI 5232 (NCPPB 633).

The genus *Xanthomonas* comprises a diverse and economically important group of bacterial pathogens, some of which are quarantine pathogens that cause bacterial spots, rots, wilts, blights, and cankers of plants, leaves, stems, and fruits on a wide variety of plant species (1, 2). The majority of the pathogenic *Xanthomonas* species reveal high degrees of host specificity, and some are divided into multiple pathovars based on their host specificity. The formal description of each species includes a type strain, and each pathovar has a designated pathotype strain.

Xanthomonas hortorum pv. hederae causes bacterial leaf spot and stem canker on English ivy (Hedera helix L.), as well as on plants of the genera Dizygotheca, Schefflera, Brassaia, Polyscias, and Fatsia and on the species Fatshedera araliaceous. It was originally described in France in 1920 (3, 4). Vauterin et al. in 1990 (5) proposed the reclassification of this pathovar from X. campestris to X. hortorum pv. hederae based on DNA hybridization, metabolic similarities, and protein profiles. The type strain of the species X. hortorum and pathotype strain of X. hortorum pv. hederae (WHRI 7744 = NCPPB 939 = ICMP 453) originates from the United States in 1943.

Bacterial leaf streak (BLS) caused by *X. oryzae* pv. *oryzicola* was first reported in the Philippines in 1918 and is present in tropical and subtropical Asia, including China, Malaysia, India, and Indonesia, and also in northern Australia and West Africa (6–8). Several studies, based on DNA fingerprinting, revealed high variability among *X. oryzae* pv. *oryzicola* strains (7, 8). The pathotype strain (WHRI 5234 = NCPPB 1585 = ICMP 5743) is from Malaysia from 1964.

X. citri subsp. *malvacearum* causes bacterial blight of cotton plants (9). This is one of the most devastating bacterial diseases that plague cotton plants worldwide. *X. citri* subsp. *malvacearum* has a wide range of aggressiveness depending on the host species (10, 11), and 19 physiological races have been identified. Race 1 is widespread in Australia, India, and the United States, and race 18 is present in Australia, Nicaragua, and India. Races 6, 7, and 10 were reported in Nigeria, and races 1, 2, 8, 21, 26, and 32 were reported in Syria (9). The pathotype strain (WHRI 5232 = NCPPB 633 = ICMP 5739) is from Sudan and was obtained in 1958.

The *Xanthomonas* strains were routinely grown in nutrient agar broth (peptone A, 6.0 g/liter; beef extract, 1.0 g/liter; yeast extract, 2.0 g/liter; sodium chloride, 5.0 g/liter; pH, \sim 7.3) with aeration (180 rpm) at 28°C. The genomic DNA was extracted according to bacterial genomic DNA isolation using cetyltrimethylammonium bromide (12). The

AMERICAN SOCIETY FOR

MICROBIOLOGY

Received 3 July 2018 Accepted 2 September 2018 Published 27 September 2018 Citation Michalopoulou VA, Vicente JG, Studholme DJ, Sarris PF. 2018. Draft genome sequences of pathotype strains for three pathovars belonging to three *Xanthomonas* species. Microbiol Resour Announc 7:e00923-18. https://doi.org/10.1128/MRA.00923-18.

Editor Iddo Friedberg, Iowa State University

Copyright © 2018 Michalopoulou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Panagiotis F. Sarris, p.sarris@imbb.forth.gr.