

**ELISA EMIKO OSHIRO**

**Análise funcional das proteínas  
captadoras de molibdato (ModA) e  
oligopeptídeo (OppA) de *Xanthomonas  
axonopodis* pv. *citri***

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutorado em Ciências (Microbiologia).

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

São Paulo

2009

## RESUMO

OSHIRO, E.E. **Análise funcional das proteínas ligadoras de molibdato (ModA) e oligopeptídeo (OppA) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Tese de Doutorado (Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O Brasil é o maior produtor de citros do mundo, cujo agronegócio tem sido afetado pelo cancro cítrico. A doença é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) que por sua vez infecta laranjais e induz a morte prematura do hospedeiro e quebra de produção. O sequenciamento do genoma de *Xac* abriu perspectivas para o estudo de genes envolvidos com diferentes aspectos da fisiologia do patógeno, incluindo sistemas de captação de nutrientes. Os sistemas de captação de molibdato e oligopeptídeo são transportadores do tipo ABC, envolvidos na captação desses nutrientes em diferentes espécies de bactérias. O molibdato faz parte da estrutura da molibdopterina, um cofator para enzimas envolvidas na fixação de nitrogênio, enxofre e carbono. Oligopeptídeos estão envolvidos na nutrição bacteriana e processos de sinalização intercelular tais como aqueles envolvidos em quimiotaxia, conjugação, formação de esporo e desenvolvimento do estado de competência. O objetivo do presente estudo foi investigar, em condições *in vitro* e *in vivo*, o papel funcional das proteínas ligadoras dos sistemas de captação de molibdato e oligopeptídeo na linhagem 306 de *Xac*. Linhagens mutantes foram construídas após inserção de cassete gênico no gene *modA*. O ensaio de captação de molibdato mostrou que o sistema tem afinidade pelo substrato, mas não foi capaz de evidenciar diferenças entre as linhagem selvagem e mutante. A produção de goma xantana, formação de biofilme e adesão mostraram-se alteradas em condições *in vitro* na linhagem mutante (*XNmodA5*). *In vivo* o mutante *modA*<sup>-</sup> mostrou alterações nas lesões causadas

em citros, evidenciadas em hospedeiro mais suscetível como a *grapefruit*. Em contato com as células do hospedeiro a expressão do gene *gumB*, mostrou-se reduzida na linhagem *XNmodA5* sugerindo que a mutação causada no gene *modA* afeta a regulação do gene responsável pela polimerização da goma xantana, desencadeando uma cascata de eventos que culmina na alteração do fenótipo de cancro cítrico. O mutante na proteína OppA apresentou maior auto-agregação, o que levou à alteração da estrutura do biofilme e, conseqüentemente, diminuiu a capacidade de adesão não dependente da produção de goma. Ensaio para medição da capacidade de captação de oligopeptídeos em *Xac* foram dificultados pela produção de proteases secretadas que degradam o peptídeo analisado. Apesar da linhagem mutante não alterar o fenótipo de patogenicidade, a sua capacidade de crescimento foi afetada no início da fase estacionária quando em contato com a planta sugerindo que o sistema Opp desempenha algum papel fisiológico.

Palavras-chaves: *Xac*; proteína ModA; proteína OppA; análise funcional; curva de crescimento; biofilme; adesão.

## ABSTRACT

OSHIRO, E.E. **Functional analysis of binding proteins of molybdate (ModA) and oligopeptide (OppA) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Doctoral Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Brazil is the largest producer of *citrus* in the world, whose agribusiness has been affected by citrus canker. The disease is caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), which infects orange trees and induces premature death of the host and loss of production. The sequencing of the genome of Xac opened perspectives for the study of genes involved in different aspects of the physiology of the pathogen, including nutrient uptake systems. The molybdate and oligopeptide uptake systems are ABC transporters responsible for uptake of these two nutrients in different bacterial species. Molybdenum is part of the molybdopterin structure, a cofactor for enzymes involved in nitrogen, sulfur and carbon fixation. Oligopeptides are involved in nutrition and bacterial intercellular signaling processes such as those involved in chemotaxis, conjugation, formation of spores and development of the competence state. The aim of this study was to investigate, under *in vitro* and *in vivo* conditions, the functional role of the molybdate and oligopeptide binding proteins in the Xac 306 strain. Mutant strains were constructed after insertion of the antibiotic resistance cassette into the *modA* gene. The molybdate uptake assay showed that the system has enough affinity for the substrate, but did not show differences between wild type and mutant strains. The xanthan gum production, biofilm formation and adhesion were affected under *in vitro* conditions in the *modA* mutant strain (XNmodA5). *In vivo*, the *modA* mutant showed changes in the lesions caused in *Citrus* as evidenced in more susceptible

hosts like *grapefruit*. In contact with the host cell, the *gumB* gene expression was reduced in *XNmodA5* strain suggesting that the mutation caused the *modA* gene affects the regulation of the gene responsible for polymerization of xanthan gum, triggering a cascade of events culminating in the change of phenotype of citrus canker. The *oppA* mutant showed more auto-aggregated cells that changed biofilm structure and, consequently, reduced the adhesion capacity not dependent on xanthan gum production. The oligopeptide uptake assay was impaired by production of secreted proteases that degrades the peptide analyzed. Although the mutant *oppA* strain does not change phenotypic of pathogenicity traits, its capacity for growth was affected at the early stationary phase when in contact with the plant suggesting that the Opp system plays some physiological role.

Key-word *Xac*; *ModA* protein; *OppA* protein; functional analysis; growth curve; biofilm; adhesion.

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura exerce fundamental importância na atividade agrícola brasileira e é um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento de agronegócios. A agroindústria citrícola movimenta R\$9 bilhões e gera 400 mil empregos diretos e indiretos (PENSA, 2006). Tanto a laranja *in natura* quanto os seus derivados como o suco concentrado, farelo de polpa cítrica e óleo essencial, são os principais produtos exportados pelo Brasil em termos de divisas geradas (US\$ 1 bilhão/ ano) (NEVES et al., 2001). Em 2005, Brasil e EUA produziram 89% do suco concentrado no mundo, sendo o Brasil responsável por 59%, equivalente a 1,40 milhões de toneladas. No mesmo ano, as exportações mundiais foram de 1,65 milhões de toneladas, sendo 83% do Brasil e 5% dos EUA (PENSA, 2006).

No estado de São Paulo a citricultura é a segunda atividade rural em importância, e em muitas cidades representa a base quase total da economia. O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, sendo que 77% da produção estão concentrados na região sudeste. Na última década, citricultores brasileiros vêm sofrendo grandes prejuízos com o cancro cítrico, que acomete todas as variedades e espécies de citros.

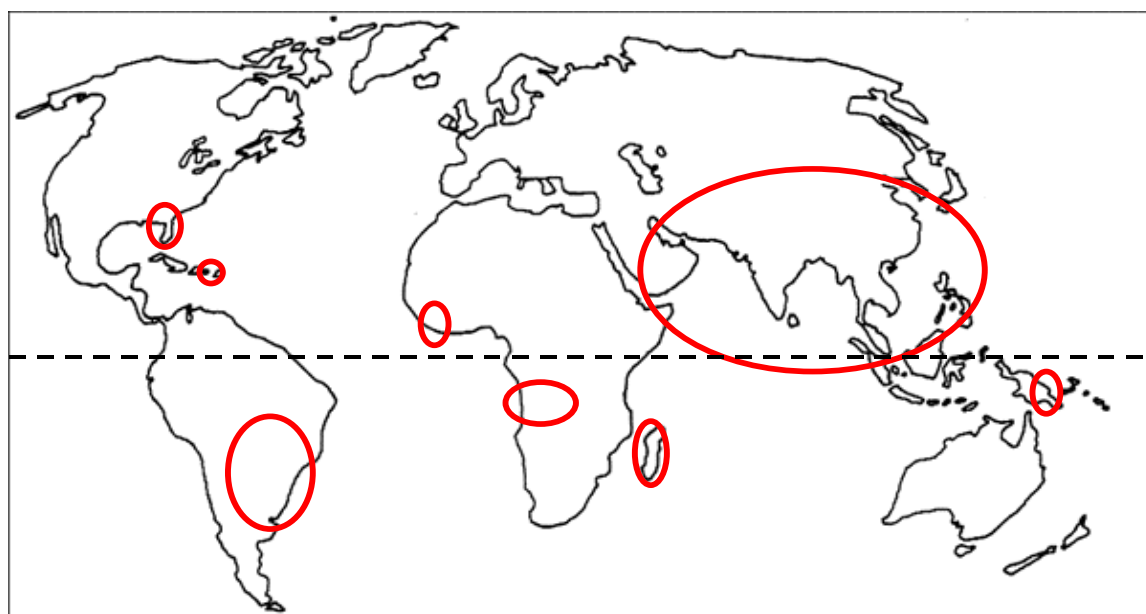
Os sintomas da doença nas folhas iniciam com o surgimento de pontos circulares de 2-10mm usualmente na superfície abaxial, que se rompem pelos dois lados da folha devido à hiperplasia (excessivas divisões celulares mitóticas) tecidual causada pelo patógeno (BRUNINGS e GABRIEL, 2003; DAS, 2003). Nos estágios mais avançados da doença as folhas ficam corticosas com centro marrom e um anel amarelado ao redor. No caule as lesões também são salientes (FUNDECITRUS). As frutas infectadas com a bactéria apresentam lesões circulares como bolhas levantadas, crescendo dentro de pústulas esponjosas

amarelas ou brancas. Posteriormente essas pústulas se tornam escuras e espessas como cortiças marrons apesar de não serem profundas. Infecções severas resultam em desfoliação, morte, deformação do fruto além da sua queda prematura (BRUNINGS e GABRIEL, 2003; DAS, 2003).

Há cinco diferentes formas de cancro cítrico, causadas pelos vários patovares da bactéria *Xanthomonas axonopodis*. A distribuição geográfica e o tipo de hospedeiro do patógeno são as principais maneiras de diferenciar essas formas (Figura 1). A forma mais severa da doença, e a mais disseminada (Ásia, África, Américas e Oceania), é a forma asiática (cancrose A) causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac). A forma asiática infecta várias espécies de citros. A segunda forma de cancrose é a forma B, causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* e está limitada ao hospedeiro limão, além de possuir disseminação restrita a poucos países. A forma B causa sintomas similares aos da forma asiática, porém menores e com um processo infeccioso mais lento. A terceira forma de cancrose é a C, causada por uma variante da *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* e está restrita a lima Mexicana no Brasil. É capaz de desenvolver os mesmos sintomas que a cancrose A em lima Mexicana (DAS, 2003; SCHAAD et al., 2005). A cancrose D é restrita em lima Mexicana no México, conhecida por falhar em causar sintomas em fruta e é serologicamente diferente que as formas A/B e C. A forma mais branda é a cancrose F, pois os sintomas se assemelham ao cancro cítrico sem a erupção e sim com manchas. Por essa razão, a cancrose F é conhecida como a mancha bacteriana dos citros, doença restrita aos viveiros na Flórida cujo agente causador é *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (DAS, 2003; SCHAAD et al., 2005). Com base em análises de reassociação de DNA-DNA, sequenciamento de espaços intergênicos, perfil rep-PCR e traços fenotípicos Schaad e colaboradores (2006) propuseram uma nova reclassificação e nomenclatura para as linhagens de bactérias

causadoras de cancro cítrico. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* passou a ser *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* passou a ser *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelonis* passou a ser *Xanthomonas alfafeae* subsp. *citrumelonis*. Análises filogenéticas de seqüências parciais do gene *gyrB* desenvolvidas por Parkinson e colaboradores (2007) sustentam as diferenças encontradas entre *X. citri* e *X. fuscans*.

Devido às perdas econômicas causadas pelo cancro cítrico A, o genoma da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi totalmente seqüenciado por um consórcio brasileiro denominado ONSA da FAPESP (DA SILVA *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Mapa da distribuição do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) (DAS, 2003)

Este sequenciamento abriu perspectivas para a caracterização genética e funcional de genes relacionados à virulência e ao metabolismo primário por meio de abordagens baseadas no conceito da genética reversa. Por essa estratégia, genes específicos são inativados por meio de deleções ou inserções construídas *in vitro* para, em seguida, serem

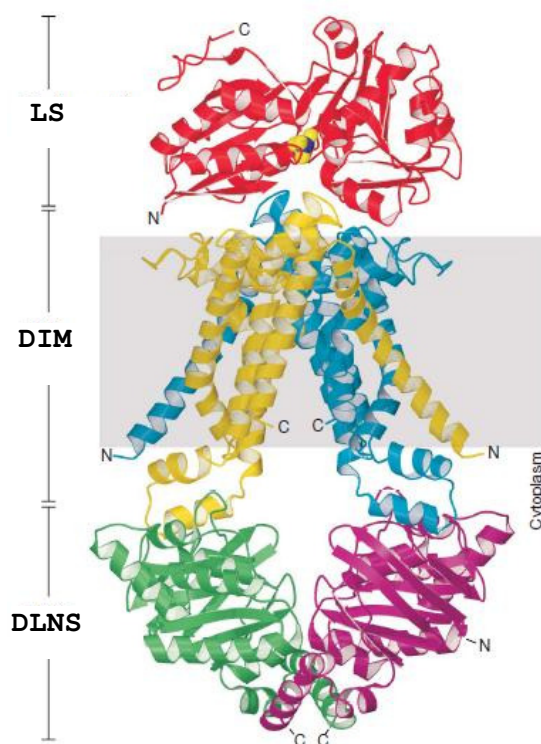


utilizadas na substituição dos alelos nativos presentes no DNA cromossômico. A identificação de genes envolvidos nos mecanismos de patogenicidade ou como possíveis alvos de controle terapêutico representam prioridade no estudo fisiológico deste microrganismo. Neste aspecto, os sistemas de transporte de nutrientes representam um elo essencial entre a capacidade de obter energia e precursores metabólicos e a capacidade de crescer e causar doenças pela *Xac*.

A definição completa do sequenciamento genômico da *Xac* revelou que aproximadamente 4% dos genes estruturais são dedicados à síntese de componentes responsáveis pelo sistema de transporte dependente de ATP. Em *Xac* são encontrados 47 sistemas do tipo ABC (ATP Binding Cassete), correspondendo a quase 25% do total de proteínas dos diversos sistemas de transporte (BALAN *et al.*, 2005).

Os transportadores ABC encontrados em eucariotos e procariotos constituem uma grande família de permeases de multi-subunidades que transportam várias moléculas (íons, aminoácidos, peptídeos, antibióticos, polissacarídeos e proteínas) através das membranas com relativa especificidade para substratos. Esse transporte acopla a hidrólise de ATP e pode ser classificado em importadores e exportadores (BRAIBANT *et al.*, 2000; DAVIDSON *et al.*, 2008). Os ABC transportadores podem ser divididos em três principais categorias funcionais dependendo da direção do deslocamento da substância em relação a célula: importadores, exportadores, e uma terceira categoria não envolvida no transporte e sim na tradução do RNAm e reparo de DNA (DAVIDSON *et al.*, 2008). Os sistemas de transporte importador do tipo ABC são encontrados exclusivamente em bactérias e são formados por três componentes, funcionais e estruturalmente distintos. Dois componentes apresentam-se associados à membrana citoplasmática enquanto o terceiro componente mostra-se solúvel nas bactérias gram-negativas, ou associado à membrana citoplasmática nas bactérias gram-

positivas. Um dos componentes associados a membranas é responsável pela formação do poro por onde a substância será transportada. Esse componente, denominado domínio integral de membrana (DIM), é formado por duas proteínas hidrofóbicas que atravessam a membrana citoplasmática. O segundo componente do sistema ABC de transporte de bactérias é representado por dois domínios geradores de energia, proteínas associadas à face interna da membrana citoplasmática que ligam ATP e chamadas de domínios de ligação de nucleotídeos (DLNS), que acoplam a hidrólise do ATP com o processo de transporte. O terceiro componente está envolvido com a ligação ao substrato, é chamado de ligador de substrato (LS) e é responsável pela especificidade e afinidade do sistema (Figura 2). Em bactérias gram-negativas, esse componente é solúvel e encontra-se livre no periplasma enquanto que em bactérias gram-positivas, os LS são encontrados na forma de lipoproteínas ancoradas por meio de uma acil-gliceril-cisteína N-terminal à face externa da membrana citoplasmática (DASSA, 2000; BIEMANS-OLDEHINKEL *et al.*, 2006; LINTON, 2007).



**Figura 2:** Organização dos transportadores ABC em bactérias gram-negativas. O componente periplasmático é a proteína ligadora de substrato (LS), os domínios integrais de membrana (DIM) estão associados a membrana plasmática e o domínio ligador de nucleotídeos (DLNS) está no espaço citoplasmático. Estrutura resolvida do sistema de captação de molibdato de *A. fulgidus* (adaptado de HOLLENSTEIN *et al.*, 2007).

O sistema de transporte dependente de proteínas ligadoras foi identificado pela primeira vez em bactérias gram-negativas. A captação de uma grande variedade de nutrientes parece ser a função mais importante desses sistemas, embora a exportação de drogas em bactérias, secreção do fator de virulência hemolisina, proteases extracelulares e toxinas, sinal de transdução, interação parasitária planta-bactéria, transporte de ferormônios, reconhecimento de sinal na quimiotaxia e esporulação são também importantes processos em que os transportadores ABC estão envolvidos (DEAN e ALLIKMETS, 1995; BOOS e LUCHT, 1996; BIEMANS-OLDEHINKEL *et al.*, 2006).

Dentre os sistemas de transporte ABC, será dada uma ênfase maior aos sistemas de captação de molibdato e de oligopeptídeos.

### **1.1 Sistema de captação de molibdato**

Molibdênio (Mo) é um metal de transição, essencial para sistemas biológicos em microorganismos, plantas e animais (HILLE, 2002; KAISER *et al.*, 2005; MENDEL, 2005). Em média o molibdênio está disponível na litosfera em níveis acima de 2-3 mg/kg (FORTESCUE, 1992) e as formas minerais encontradas nas rochas podem ser molibdenito ( $\text{MoS}_2$ ), vulfenito ( $\text{PbMoO}_4$ ) e ferrimolibdenito [ $\text{Fe}_2(\text{MoO}_4)$ ] (KAISER *et al.*, 2005). A liberação do molibdênio da forma mineral sólida ocorre por meio da ação do tempo que envolve uma solução contínua e reações de oxidação. O molibdênio dissolvido encontra-se abundante na forma de ânion  $\text{MoO}_4^-$  nos oceanos e nos solos, podendo associar-se a outros íons formando complexos com Na, K, Ca e Mg (LINDSAY, 1979; MENDEL, 2005). Nas saídas hidrotermais no fundo dos oceanos, sob condições anaeróbias, as bactérias extremófilas utilizam tungstênio (W) ao invés de Mo devido principalmente às altas concentrações de enxofre. Nessas condições o molibdênio se encontra na forma de  $\text{MoS}_2$  tornando-se indisponível para sistemas biológicos (WILLIANS e FRAUSTO DA SILVA, 2002; HILLE, 2002; MENDEL, 2005). Tanto o molibdênio quanto o tungstênio são muito úteis em sistemas biológicos devido à sua versatilidade química (HILLE, 2002), com alta capacidade de fornecer elétrons e habilidade de transferir átomos de oxigênio e enxofre, ou seja, possuem alto potencial redutor (WILLIANS e FRAUSTO DA SILVA, 2002).

Os metais como molibdato e tungstênio sozinhos não são biologicamente ativos, por isso estão sempre associados a um

complexo orgânico pterina chamado de metaloproteínas (REES, 2002; KAISER *et al.*, 2005; MENDEL, 2005). Esses tipos de proteínas são compostos por dois componentes, proteína e metais associados a grupos inorgânicos. Os ligantes inorgânicos incluem grupos sulfitos ( $S^{2-}$ ), água ( $H_2O$  ou  $OH^-$ ), monóxido de carbono (CO) e cianido ( $CN^-$ ); moléculas mais complexas podem também ser utilizadas como ligantes, tais como homocitrato e dithiols (REES, 2002). Molibdênio é ligado a um composto pterina tricíclica única chamada de cofator de molibdênio (Moco) que liga diversas apoproteínas. Essas molibdoenzimas são essenciais nas reações redox dos ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre. Mais de 40 Moco estão amplamente distribuídos entres todos os reinos, sendo a maioria encontrada em bactérias, 4 nas plantas e 3 em humanos (MENDEL, 2005).

Em *E.coli*, com exceção da biotina sulfoxide redutase, as molibdoenzimas descritas (nitrato redutase, formato desidrogenase, dimetil sulfoxideo redutase e trimetilamina N-ódixo redutase) participam como co-fatores enzimáticos nos processos de respiração anaeróbica e fermentação (RECH *et al.*, 1996; SELF *et al.*, 2001). A família das molibdoenzimas xantina oxidase, aldeído oxidase e sulfito oxidase são prevalentes em organismos eucariotos (KISKER *et al.*, 1997; SCHWARZ, 2005).

Para produzir molibdoenzimas, muitos organismos desenvolveram sistemas de captação de molibdênio de alta afinidade, respondendo a uma condição natural de baixa concentração deste metal no meio ambiente (RECH *et al.*, 1995; SELF *et al.*, 2001).

Apesar dos genes que participam do transporte de molibdato (Mod), serem conhecidos como um sistema de transporte periplasmático por analogia aos genes *hisP* e *malK* (HEMSHEMEIER *et al.*, 1991), somente em 1995 os genes

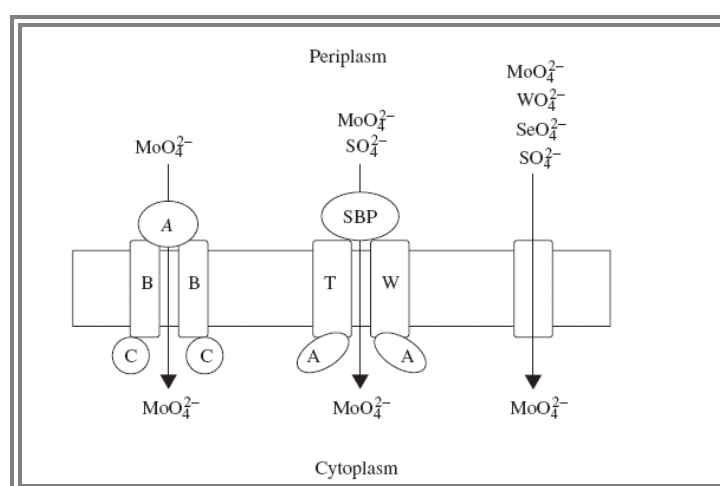
relacionados com a captação de Mo foram caracterizados por Maupin-Furlow e colaboradores (1995).

O sequenciamento dos genes do sistema Mod de *E.coli* apresentou dois óperons distintos. Os genes estruturais para o transporte são codificados pelo óperon *modABCD*. A proteína reguladora (ModE) é codificada pelo óperon *modEF* (MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995; GRUNDEN e SHANMUGAN, 1997; SELF *et al.*, 2001).

O gene *modA* tem 774 pb e seu produto protéico possui 257 aa e massa molar estimada de 27 kDa (MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995). Contudo, foi observado que a proteína madura era de 22,5kDa, mostrando a perda de uma sequência sinal de 24 aa (RECH *et al.*, 1996; SELF *et al.*, 2001). Rech e colaboradores (1996) demonstraram que o único íon além do próprio molibdato com afinidade à proteína ligadora foi o tungstênio, com um  $K_D$  de  $20 \pm 8$  nM. Entretanto, com a cristalização da proteína ModA, foi possível detectar uma ligação de baixa afinidade para o substrato sulfato com um  $K_D$  maior que 2 mM (HU *et al.*, 1997; SELF *et al.*, 2001).

A proteína ModB é codificada por uma sequência de 690 pb e possui peso molecular de 24 kDa (229 aa). O gene *modC* (1059 pb) codifica uma proteína de peso molecular de 37,5 kDa (352 aa). O papel fisiológico da quarta proteína do óperon *ModABCD* permanece desconhecido. A proteína ModD possui um sequência de nucleotídeo de 696 pb e um peso molecular de 26,33 kDa (231 aa). A proteína ModE é transcrita constitutivamente a partir do óperon *ModEF* (2262 pb) e possui massa de 28 kDa (262 aa). Mutações na proteína ModE levam à expressão constitutiva do óperon *modABCD*, sugerindo que esta proteína desempenha um papel regulador no transporte de molibdato. A proteína ModF não tem função conhecida, possui massa de 54 kDa (490 aa) e tem a transcrição regulada pelo complexo protéico ModE-Mo (GRUNDEN *et al.*, 1996; GRUNDEN e SHANMUGAN, 1997).

Deficiências no sistema de captação de molibdato, causadas por mutações nos genes do óperon *modABC*, podem ser avaliadas pela atividade de todas as molibdoenzimas. Defeitos pleitrópicos em enzimas como a formato dehidrogenase geradas pelas mutações nos genes do óperon *modABC*, podem ser revertidos adicionando-se molibdato ao meio de cultura (MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995). Contudo, a quantidade de molibdato necessária para a máxima atividade enzimática depende das concentrações de sulfato no meio. Mutantes nos genes *modA*, *modB* ou *modC* quando cultivados com 15mM de sulfato requisitam quantidades 10 vezes maiores de molibdato quando comparados a culturas suplementadas com baixa concentração de sulfato. Isso significa que os substratos molibdato e sulfato competem entre si para serem transportados pelo sistema de captação de sulfato. Na ausência do sistema Mod, o sistema de captação de sulfato funciona como uma via alternativa ao transporte de molibdato (GRUNDEN e SHANMUGAN, 1997) e na ausência dos dois sistemas um terceiro sistema de captação inespecífico incorpora molibdato quando suplementado em maiores quantidades (ROSENTEL *et al.*, 1995) (Figura 3).



**Figura 3:** Sistema de transporte de molibdato em *E. coli*. O transporte de molibdato em *E. coli* envolve três sistemas. O Complexo protéico ModABC, um complexo protéico de sulfato similar ao CYS UWA e um canal de ânion não específico não identificado. (SELF *et al.*, 2001 e KAISER *et al.*, 2005).

Ortólogos em outros microrganismos têm sido caracterizados em *Rhodobacter capsulatus* (WANG et al., 1993), *Azotobacter vinelandii* (MOUNCEY et al., 1996), *Staphylococcus carnosus* (NEUBAUER et al., 1999), *Haloferax volcanii* (WANNER et al., 1999), *Anabaena variabilis* (ZAHALAK et al., 2004), *Bradyrhizobium japonicum* (DELGADO et al., 2006) e *Archaeoglobus fulgidus* (HOLLENSTEIN et al., 2007). A organização genética do sistema de captação de molibdato desses organismos encontra-se na forma de óperons policistrônicos, exceto nas cianobactérias como *Anabaena spp.*, que apresenta o gene *modB* fusionado ao *modC* como se fosse um único gene *modBC* distante do gene *modA* (ZAHALAK et al., 2004). A maioria deles não apresenta regulação negativa pela proteína ModE, sugerindo uma expressão constitutiva do sistema. Em *R.capsulatus* o óperon *modABC* está localizado entre os genes da molibdoenzima nitrogenase (*nif*) e é aparentemente regulado junto com este óperon *nif* (KUTSCHE et al., 1996). Além da organização genética, esses microrganismos compartilham outras características comuns, tais como ativação da transcrição em carência de Mo, similaridade entre os genes e utilização do sistema de captação de sulfato como uma via alternativa na ausência do sistema Mod.

No gênero *Xanthomonas* a organização genética do sistema Mod na forma de óperon é conservada e presente nas 8 linhagens sequenciadas do gênero *Xanthomonas* sendo uma *X.axonopodis* pv. *citri* (DA SILVA et al., 2002), três *X.campestris* pv. *campestris* (DA SILVA et al., 2002; QIAN et al., 2005; VORHÖLTER et al., 2008), três *X.oryzae* pv. *oryzae* (LEE BM et al., 2005; SALZBERG et al., 2008) (NCBI gene bank AP008229) e uma *X.campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 (THIEME et al., 2005).

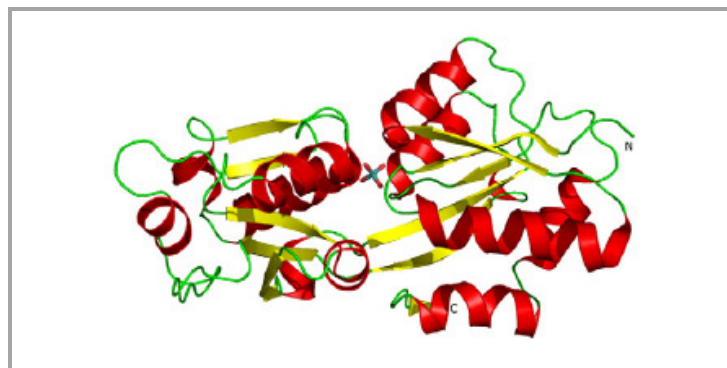
O sistema de captação de molibdato em *Xanthomonas* é carente da proteína ModE, que reprime, em *E. coli*, a transcrição do sistema em ambiente rico em Mo. As análises de seus genomas revelam que os genes à montante e à jusante não



pertencem às famílias de molibdoenzimas, estando assim, livres da regulação de outros óperons. Tais evidências sugerem que o sistema Mod funcione de forma constitutiva.

Recentemente Balan e colaboradores (2008) resolveram a estrutura da proteína ModA, que apesar da baixa identidade de amino ácidos com a estrutura descrita em *E. coli*, apresentou uma alta similaridade estrutural entre elas (Figura 4). A proteína madura ModA de *Xac* possui um peso molecular de 25kDa (777pb) e liga molibdato com maior afinidade ( $K_d=290\text{nM}$ ) que tungstênio ( $K_d=580\text{nM}$ ) (Balan *et al.*, 2006). Essas constantes de dissociação estão na média de valores apresentados para ortólogos de *E.coli* ModA+Mo ( $K_d= 20\text{nM}$  e  $3\mu\text{M}$ ), ModA+W ( $K_d=67\text{nM}$ ) (RECH *et al.*, 1996; IMPERIAL *et al.*, 1998; SELF *et al.*, 2001).

As proteínas ModB e ModC possuem tamanhos de 693pb e 615pb, respectivamente. A primeira codifica uma proteína com 230 resíduos de aminoácidos e a segunda uma proteína de 204 amino ácidos.



**Figura 4:** Estrutura da proteína ModA de *Xac*. Esquema da estrutura terciária da ModA de *Xac* com o íon associado ao sítio ligador (BALAN *et al.*, 2008).

## 1.2 Sistema de captação de oligopeptídeos

Oligopeptídeos desempenham papéis importantes na nutrição bacteriana e representa fontes de nitrogênio, carbono e outros elementos. Trabalhos descrevem o envolvimento de oligopeptídeos em processos de sinalização intercelular, tais como quimiotaxia, conjugação, formação de esporos e desenvolvimento do estado de competência (DETMERS *et al.*, 2001). Em bactérias entéricas como *E. coli* e *S. typhimurium*, existem pelo menos três sistemas distintos de transporte de peptídeos bem caracterizados: o sistema de transporte de dipeptídeos (Dpp), o sistema de transporte de tripeptídeos (Tpp) e o sistema de captação de oligopeptídeos (Opp) (HILES *et al.*, 1987).

O sistema Dpp está envolvido com o comportamento quimiotático de bactérias e tem especificidade para dipeptídeos (MANSON *et al.*, 1986). O sistema Tpp é induzido durante o crescimento em anaerobiose e tem afinidade e especificidade para tripeptídeos hidrofóbicos (ANDREWS e SHORT, 1985). O sistema Opp em *S. typhimurium* reconhece peptídeos formados por dois a cinco resíduos de aminoácidos e se caracteriza pela grande afinidade aliada a baixa especificidade em relação ao tamanho e a seqüência do peptídeo transportado (TAME *et al.*, 1995). Em bactérias como *Helicobacter pylori* o sistema Opp possui preferência por aminoácidos menores que quatro aminoácidos e o sistema Dpp por certos dipeptídeos (Ala-Ile and Ile-Ser) e peptídeos de seis ou mais aminoácidos (WEINBER e MAIER, 2007). O sistema Opp em *Lactococcus lactis* é capaz de captar peptídeos com até 35 resíduos de aminoácidos, mas possui maior afinidade por nonapeptídeos e a seletividade é definida pelos aminoácidos posicionados no meio e na região C-terminal do peptídeo (DETMERS *et al.*, 2000).

O sistema Opp em bactérias é um sistema de transporte dependente de ATP (sistema do tipo ABC) constituído pela proteína periplasmática OppA responsável pela ligação aos peptídeos, e quatro proteínas de membrana citoplasmática (OppB, C, D, e F), responsáveis pela formação do canal na membrana citoplasmática e energização do sistema. Em *E. coli* e *S. typhimurium* os genes responsáveis pela síntese destas proteínas estão organizados na forma de um óperon policistrônico (HIGGINS e HARDIE, 1983; HILES *et al.*, 1987).

A presença de uma ou mais cópias da proteína OppA, bem como do sistema Opp completo, sugere um papel que extrapola a função nutricional. A inativação do gene *oppA* leva à resistência aos aminoglicosídeos pela impermeabilidade a estes antibióticos em *E. coli* K12 (KASHIWAGI *et al.*, 1992; 1998, TSUHAKO, *et al.*, 1998). Ortólogos desse sistema em *Staphylococcus aureus* codifica quatro distintos sistemas Opp (Opp1ABCDF, Opp2BCDF, Opp3BCDFA, Opp4ADFBC) e mais uma cópia isolada de Opp5A, que diferem entre si na organização genética, seqüência de aminoácido, regulação da expressão e papéis fisiológicos. Entretanto somente o sistema Opp3 cumpre o papel nutricional da bactéria. (HIRON *et al.*, 2007). Em *Borrelia burgdorferi* a presença de três genes *oppA* (*oppA-1,2* e 3) no cromossomo e dois abrigados em plasmídeos endógenos (*oppA-4* no cp26 and *oppA-5* no lp54) permite que haja captação de pequenos peptídeos, mas cada ortólogo possui preferência por substratos distintos (WANG *et al.*, 2004). Contudo somente a proteína OppA5 possui regulação da expressão afetada pela temperatura, sugerindo uma vantagem adaptativa as modificações ambientais (MEDRANO *et al.*, 2007). Mesmo com a presença de duas cópias do gene *oppA* em *Xenorhabdus nematophila* o sistema de transporte Opp não é essencial para a nutrição (ORCHARD e GOODRICH-BLAIR, 2004). Na bactéria fixadora de nitrogênio como *Sinorhizobium meliloti* foram descritos três sistemas transportadores ABC (Opp, Ttp e Dpp) com sobreposição de

afinidade a substratos e a ausência de captação em mutantes desses sistemas não afetou a capacidade simbiote em hospedeiro vegetal (NOGALES *et al.*, 2009). *Streptococcus uberis* também apresenta duas proteínas OppA e a função da segunda proteína parece estar relacionada à virulência devido à regulação diferenciada (TAYLOR *et al.*, 2003). Borezee e colaboradores (2000) detectaram o envolvimento do sistema Opp com a capacidade de crescimento a baixas temperaturas e sobrevivência do patógeno *Listeria monocytogenes* no meio intracelular de macrófagos. Em *Vibrio fluvialis* a mutação na proteína OppA, afetou a co-agregação das células do biofilme além de uma maior produção do mesmo (LEE EM *et al.*, 2004). O papel do sistema Opp em bactérias da cavidade oral é controverso. A mutação no gene que codifica a permease do sistema Opp afetou as propriedades de adesão e agregação do patógene *Streptococcus gordonii* (MCNAB e JENKINSON, 1998). Entretanto, mutações na proteína ligadora de oligopeptídeos da bactéria *Treponema denticola* não afetou sua capacidade de aderir a receptores ligados a células e a matriz extracelular (FENNO *et al.*, 2000) muito embora sua expressão seja abundante em diferentes condições de cultivo (VEITH *et al.*, 2009). Em *Streptococcus mutans* o mutante defectivo nas proteínas OppA e OppB também não afetou a capacidade de adesão e a produção de biofilme (NEPOMUCENO *et al.*, 2007). A inativação do gene *oppA* de *B. subtilis* resulta em deficiência na captação de peptídeos, bloqueio no processo de formação de esporos e impedimento do estado de competência, isto é, capacidade de receber DNA exógeno pelo processo de transformação (PEREGO *et al.*, 1991, KOIDE, 1994).

No genoma de *Xac* foram encontrados quatro genes pertencentes ao sistema transportador de oligopeptídeos. Estes genes estão organizados na forma de um óperon policistrônico na ordem de *opp A, B, C* e *D/F*. O gene *oppA* é constituído por 1.617 pb e codifica para uma proteína com 539 aminoácidos. O

gene *oppB*, responsável pela síntese de uma proteína constituída de 326 aminoácidos, compreende 978 pb e apresenta sobreposição de 4 pb com o final do gene *oppA*. O terceiro gene, *oppC*, é formado por 885 pb, codifica uma proteína de 295 aminoácidos e está sobreposto ao final do gene *oppB* por 4 pb. Entre os genes *oppC* e *oppD/F* existiria uma janela aberta de leitura que codificaria para uma pequena proteína com 103 aminoácidos (DA SILVA *et al.*, 2002). No entanto análises posteriores indicaram que essa sequência faria parte do gene *oppD/F* constituído por 1.443pb que codifica uma proteína de 481 aminoácidos (MOUTRAN *et al.*, 2004).

Um único ortólogo de *oppA* foi encontrado como parte de um óperon completo durante o sequenciamento do genoma de *Xac* (MOUTRAN *et al.*, 2007). A proteína OppA de *Xac* apresentou reduzida similaridade entre as sequências de aminoácidos com *S. Typhimurium*, entretanto análises de modelagem molecular da proteína OppA de *Xac* compartilham características funcionais com a proteína OppA de *S. Typhimurium* (MOUTRAN *et al.*, 2007).

A ausência do óperon *opp* do genoma de três linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) (DA SILVA *et al.*, 2002; QIAN *et al.*, 2005; VORHÖLTER *et al.*, 2008), três linhagens de *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (LEE BM *et al.*, 2005; SALZBERG *et al.*, 2008) e uma linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) (THIEME *et al.*, 2005), pode ser resultado de um evento de herança lateral ou a perda da região do genoma. A presença do sistema de captação de peptídeos apenas em *Xac* pode ter reflexos importantes sobre as estratégias nutricionais e de virulência desse patógeno. A presença do óperon *opp*, juntamente com capacidade de causar necrose e secretar proteases permitiria a *Xac* utilizar peptídeos derivados da degradação de proteínas do hospedeiro como importante fonte de nitrogênio. Tais evidências sugerem que o óperon Opp pode ter um papel importante nas diferenças observadas entre as

propriedades fisiológicas e de patogenicidade desses fitopatógenos.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho visou estudar o papel fisiológico de dois sistemas de transporte ativo, tipo ABC, relacionado ao transporte de molibdato e oligopeptídeos no fitopatógeno *Xac*. A partir das sequências identificadas no genoma da linhagem *Xac* 306 estabelecemos uma série de técnicas experimentais que permitiram avaliar os possíveis papéis fisiológicos desses sistemas de transporte no comportamento *in vitro* e *in vivo* da bactéria. Para tal finalidade realizamos o nocaute gênico preciso em *Xac* 306 por recombinação homóloga com vetor plasmidial suicida e isolamos mutante deficiente no gene *modA*, componente ligante do sistema de transporte de molibdato e no óperon *mod* completo.

As análises *in vitro* feitas com mutante deficiente em *modA* revelaram que o gene, e seu produto, não desempenha papel relevante no crescimento *in vitro* da linhagem 306 de *Xac*. No entanto, *in vivo* a linhagem *modA*<sup>-</sup> apresentou um maior crescimento celular e alterações no padrão de lesões foliares em hospedeiro suscetível de *C. paradisi* (*grapefruit*). A análise da expressão do gene *gumB* crescida em hospedeiro vegetal, apresentou uma diminuição significativa levando a uma redução na produção de goma xantana, formação de biofilme e adesão à superfície abiótica. Essa evidência foi suportada diretamente pelas imagens micrográficas da lesão foliar causada pelo mutante *modA*<sup>-</sup> onde as células bacterianas vivem dispersas em uma matriz extracelular alterada em relação à linhagem parental.

Ensaio de captação de molibdato *in vitro* revelaram que a linhagem *Xac* 306 é capaz de transportar ativamente o íon para o seu interior. No entanto, os resultados obtidos com o mutante deficiente em *modA* foram semelhantes aos observados com a linhagem parental. Tal resultado não era esperado e

sugere a presença de um sistema alternativo para captação de molibdato em *Xac* 306.

Em relação ao mutante de *Xac* 306 deficiente na expressão da proteína OppA, nossos resultados foram prejudicados por problemas metodológicos relacionados à análise de captação de oligopeptídeos. A produção de grande quantidade de proteases para o meio extracelular impediu a visualização da captação de um tetrapeptídeo pela linhagem *Xac* 306 assim como o mutante isogênico *oppA*<sup>-</sup> gerado. Entretanto a proteína OppA parece estar relacionada a um papel nutricional pela alteração na cinética de crescimento em hospedeiro vegetal. A formação do biofilme e a adesão também foram alteradas e sugerem que a proteína OppA tenha um papel que extrapola função nutricional.

Por fim, concluímos que o trabalho realizado ao longo do período de execução da tese permitiu que técnicas genéticas, bioquímicas e microbiológicas fossem estabelecidas no laboratório e aplicadas à linhagem 306 de *Xac*. As evidências geradas contribuem para o esclarecimento dos papéis funcionais das proteínas ligadoras dos sistemas de captação de molibdato e oligopeptídeos no crescimento *in vivo* de *Xac* 306, suportadas por evidências *in vitro* e podem contribuir futuramente para o desenvolvimento de modelos biológicos de combate ao cancro cítrico.



**REFERÊNCIAS\***

AHMED, M.J.; HAQUE, M.E. A rapid spectrophotometric method for the determination of molybdenum in industrial, environmental, biological and soil samples using 5,7-dibromo-8-hydroxyquinoline. **Anal. Sci.**, v.18, n.4, p.433-439, 2002.

AMUNDSEN, S.K.; SMITH, G.R. Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. **Cell**, v.112, n.6, p.741-744, 2003.

ANDREWS, J.C.; SHORT, S.A. Genetic analysis of *Escherichia coli* oligopeptide transport mutants. **J. Bacteriol.**, v.161, p.484-492, 1985.

ANSORGE-SCHUMACHER, M.B.; STEINSIEK, S.; EBERHARD, W.; KERAMIDAS, N.; ERKENS, K.; HARTMEIER, W.; BÜCHS, J. Assaying CO<sub>2</sub> release for determination of formate dehydrogenase activity in entrapment matrices and aqueous-organic two-phase systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v.95, n.1, p.199-203, 2006.

ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. Bacteriol.**, v.187, n.3, p.1201-1205, 2005.

AZZI, A.; CASEY, R.P.; NAŁECZ, M.J. The effect of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide on enzymes of bioenergetic relevance. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.768, n.3-4, p.209-226, 1984.

BALAN, A.; DE SOUZA, C.S.; MOUTRAN, A.; FERREIRA, R.C.; FRANCO, C.S.; RAMOS, C.H.; DE SOUZA FERREIRA, L.C. Purification and in vitro characterization of the maltose-binding protein of the plant pathogen *Xanthomonas citri*. **Protein Expr. Purif.**, v.43, n.2, p.103-110, 2005.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALAN, A.; SANTACRUZ-PÉREZ, C.; MOUTRAN, A.; FERREIRA, L.C.; NESHICH, G.; GONÇALVES BARBOSA, J.A. Crystallographic structure and substrate-binding interactions of the molybdate-binding protein of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1784, n.2, p.393-399, 2008.

BALDINI, R.L.; TAHARA, S.T.; ROSATO, Y.B. A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. **Plasmid**, v.42, n.2, p.126-133, 1999.

BIEMANS-OLDEHINKEL, E.; DOEVEN, M.K.; POOLMAN, B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. **FEBS Lett.**, v.580, n.4, p.1023-1035, 2006.

BOOS, W.; LUCHT, J.M. Periplasmic binding-protein-dependent ABC transporters. In: INGRAHAM, J.L e NEIDHARDT, F.C (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella typhimurium; cellular and molecular biology**. Washington: American Society of Microbiology. 1996. p. 1175-1209.

BOREZEE, E.; PELLEGRINI, E.; BERCHE, P. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. **Infect. Immun.**, v.68, n.12, p.7069-7077, 2000.

BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microb. Rev.**, v.24, p.449-467, 2000.

BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. **Mol. Plant Pathol.**, v.4, n.3, p.141-157, 2003.

CANTLEY, L.C. JR.; JOSEPHSON, L.; WARNER, R.; YANAGISAWA, M.; LECHENE, C.; GUIDOTTI, G. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. **J Biol Chem.**, v.252, n.21, p.7421-7423, 1977.

CARDENAS, J.; MORTENSON, L.E. Determination of molybdenum and tungsten in biological materials. **Anal. Biochem.**, v.60, n.2,

p.372-381, 1974.

DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.; DO AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.; FERREIRA, R.C.; FERRO, M.I.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R.F.; SPINOLA, L.A.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, n.6887, p.459-463, 2002.

DAS, A.K. Citrus canker - A review. **J. Appl. Hort.**, v.5, n.1, p.52-60, 2003.

DASSA, E. ABC transport. In:\_\_\_\_. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**. New York: Academic Press, 2000 p.1-12.

DAVIDSON, A.L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.72, n.2, p.317-364, 2008.

DEAN, M.; ALLIKMETS, R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.5, n.6, p.779-785, 1995.

DELGADO, M.J.; TRESIERRA-AYALA, A.; TALBI, C.; BEDMAR, E.J. Functional characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* *modA* and *modB* genes involved in molybdenum transport. **Microbiology**, v.152, n.1, p.199-207, 2006.

DETMERS, F.J.; KUNJI, E.R.; LANFERMEIJER, F.C.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. Kinetics and specificity of peptide uptake by

the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. **Biochemistry**, v.37, n.47, p.16671-16679, 1998.

DETMERS, F.J.; LANFERMEIJER, F.C.; ABELE, R.; JACK, R.W.; TAMPE, R.; KONINGS, W.N.; POOLMAN, B. Combinatorial peptide libraries reveal the ligand-binding mechanism of the oligopeptide receptor OppA of *Lactococcus lactis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.97, n.23, p.12487-12492, 2000.

DETMERS, F.J.; LANFERMEIJER, F.C.; POOLMAN, B. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. **Res. Microbiol.** v.152, p.245-58, 2001.

DOEVEN, M.K.; ABELE, R.; TAMPE, R.; POOLMAN, B. The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.31, p.32301-32307, 2004.

DOEVEN, M.K.; VAN DEN BOGAART, G.; KRASNIKOV, V.; POOLMAN, B. Probing receptor-translocator interactions in the oligopeptide ABC transporter by fluorescence correlation spectroscopy. **Biophys. J.**, v.94, n.10, p.3956-3965, 2008.

DOW, M. Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. **Sci. Signal.**, v.1, n.21, p.1-3, 2008.

ELLIOTT, B.B.; MORTENSON, L.E. Transport of molybdate by *Clostridium pasteurianum*. **J. Bacteriol.**, v.124, n.3, p.1295-1301, 1975.

FENNO, J.C.; TAMURA, M.; HANNAM, P.M.; WONG, G.W.; CHAN, R.A.; MCBRIDE, B.C. Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. **Infect Immun.**, v.68, n.4, p.1884-1892 2000.

FORTESCUE, J.A.C. Landscape geochemistry: retrospect and prospect. **Appl. Geochemistry**, v.7, p.2-53, 1992.

FUNDECITRUS FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 1 set. 2004.

GAY, P.; LE COQ, D.; STEINMETZ, M.; FERRARI, E.; HOCH, J. A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 3, n. 153, p.1424, 1983.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus canker: The pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2002.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol. Plant Pathol.**, v.5, n.1, p.1-15, 2004.

GRUNDEN, A.M.; RAY, R.M.; ROSENTEL, J.K.; HEALY, F.G.; SHANMUGAM, K.T. Repression of the *Escherichia coli* *modABCD* (molybdate transport) operon by ModE. **J. Bacteriol.**, v.178, n.3, p.735-744, 1996.

GRUNDEN, A.M.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate transport and regulation in bacteria. **Arch. Microbiol.**, v.168, n.5, p.345-354, 1997.

HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol Biol.**, v.4, n.166, p.557-580, 1983.

HEMSCHEMEIER, S.; GRUND, M.; KEUNTJE, B.; EICHENLAUB, R. Isolation of *Escherichia coli* mutants defective in uptake of molybdate. **J. Bacteriol.**, v.173, n.20, p.6499-6506, 1991.

HIGGINS, C. F.; HARDIE, M. M. Periplasmic protein associated with the oligopeptide permeases of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.3, n.155, p.1434-1438, 1983.

HILES, I. D.; GALLAGHER, M. P.; JAMIESON, D. J.; HIGGINS, C. F. Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. **J. Mol. Biol.**, v.1, n.195, p.125-142, 1987.

HILLE, R. Molybdenum and tungsten in biology. **Trends Biochem.**

**Sci.**, v.27, n.7, p.360-367, 2002.

HIRON, A.; BOREZÉE-DURANT, E.; PIARD, J.C.; JUILLARD, V. Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v.189, n.14, p.5119-5129, 2007.

HOLLENSTEIN, K.; FREI, D.C.; LOCHER, K.P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature**, v.446, n.7132, p.213-216, 2007.

HU, Y.; RECH, S.; GUNSALUS, R.P.; REES, D.C. Crystal structure of the molybdate binding protein ModA. **Nat. Struct. Biol.**, v.4, n.9, p.703-707, 1997.

IMPERIAL, J.; HADI, M.; AMY, N.K. Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli* mod molybdate transport system. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1370, n.2, p.337-346, 1998.

KAISER, B.N.; GRIDLEY, K.L.; NGAIRE BADY, J.; PHILLIPS, T.; TYERMAN, S.D. The role of molybdenum in agricultural plant production. **Ann. Bot., London**, v.96, n.5, p.745-754, 2005.

KASHIWAGI, K, A.; MIYAJI, A.; IKEDA, S.; TOBE, T.; SASAKAWA, C.; IGARASHI, K. Increased sensitivity to aminoglycoside antibiotics by polyamine-induced protein (oligopeptide-binding protein) in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.174, p.4331-4337, 1992.

KASHIWAGI, K.; TSUHAKO, M. H.; SAKATA, K.; SAISHO, T.; IGARASHI, A.; DA COSTA, S. O.; IGARASHI, K. Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and a decrease in oligopeptide binding protein. **J. Bacteriol.**, v.180, p.5484-5488, 1998.

KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; REES, D.C. Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.**, v.66, p.233-267, 1997.

KOIDE, A.; HOCH, J.A. Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of

its role in sporulation. **Mol. Microbiol.**, v.13, n.3, p.417-426, 1994.

KOWALCZYKOWSKI, S.C.; DIXON, D.A.; EGGLESTON, A.K.; LAUDER, S.D.; REHRAUER, W.M. Free in PMC Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, v.58, n.3, p.401-65, 1994.

KUTSCHE, M.; LEIMKÜHLER, S.; ANGERMÜLLER, S.; KLIPP, W. Promoters controlling expression of the alternative nitrogenase and the molybdenum uptake system in *Rhodobacter capsulatus* are activated by NtrC, independent of sigma54, and repressed by molybdenum. **J. Bacteriol.**, v.178, n.7, p.2010-2017, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.680-685, 1970.

LAIA, M.L.; MOREIRA, L.M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J.B.; FERREIRA, C.B.; FERRO, M.I.; SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; OLIVEIRA, J.C. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC. Microbiol.**, v.16, p.9-12, 2009.

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.; LEE, G.B.; KIM, H.; PARK, H.S.; YOON, K.O.; KIM, J.H.; JUNG, C.H.; KOH, N.H.; SEO, J.S.; GO, S.J. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Res.**, v.33, n.2, p.577-586, 2005.

LEE, E.M.; AHN, S.H.; PARK, J.H.; LEE, J.H.; AHN, S.C.; KONG, I.S. Identification of oligopeptide permease (opp) gene cluster in *Vibrio fluvialis* and characterization of biofilm production by oppA knockout mutation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.240, n.1, p.21-30, 2004.

LINTON, K.J. Structure and function of ABC transporters. **Physiology**, Bethesda, v.22, p.122-130, 2007.

LLOP, P.; CARUSO, P.; CUBERO, J.; MORENTE, C.; LÓPEZ, M.M. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. **J. Microbiol. Methods.**, v.1, n.37, p.23-31, 1999.

LOPEZ CORCUERA, G.; BASTIDAS, M.; DUBOURDIEU, M. Molybdenum uptake in *Escherichia coli* K12. **J. Gen. Microbiol.**, v.139, n.8, p.1869-1875, 1993.

MAIER, R.J.; GRAHAM, L. Molybdate transport by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. **J. Bacteriol.**, v.170, n.12, p.5613-5619, 1988.

MANSON, M.D.; BLANK, V.; BRADE, G.; HIGGINS, C.F. Peptide chemotaxis in *E. coli* involves the Tap signal transducer and the dipeptide permease. **Nature**, v.321, n.6067, p.253-256, 1986.

MAUPIN-FURLOW, J.A.; ROSENTEL, J.K.; LEE, J.H.; DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS, R.P.; SHANMUGAM, K.T. Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.177, n.17, p.4851-4856, 1995.

MCNAB, R.; JENKINSON, H.F. Altered adherence properties of a *Streptococcus gordonii hppA* (oligopeptide permease) mutant result from transcriptional effects on *cshA* adhesin gene expression. **Microbiology**, v.144, p.127-136, 1998.

MEDRANO, M.S.; DING, Y.; WANG, X.G.; LU, P.; COBURN, J.; HU, L.T. Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. **J. Bacteriol.**, v.189, n.7, p.2653-2659, 2007.

MEHTA, A.; ROSATO, Y.B. A simple method for *in vivo* expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Curr. Microbiol.**, v.47, n.5, p.400-403, 2003.

MENDEL, R.R. Molybdenum: biological activity and metabolism. **Dalton Trans.**, v.7, n.21, p.3404-3409, 2005.

MICIC, R.J.; SIMONOVIC, R.M.; PETKOVIC, B.B. Kinetic spectrophotometric determination of traces of molybdenum(VI) by its inhibitory effect on the oxidation of 4-



hydroxycoumarine by potassium permanganate. **Anal. Sci.**, v.22, n.5, p.793-796, 2006.

MOUNCEY, N.J.; MITCHENALL, L.A.; PAU, R.N. Mutational analysis of genes of the mod locus involved in molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v.177, n.18, p.:5294-5302, 1995.

MOUTRAN, A.; BALAN, A.; FERREIRA, L.C.; GIORGETTI, A.; TRAMONTANO, A.; FERREIRA, R.C. Structural model and ligand interactions of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* oligopeptide-binding protein. **Genet. Mol. Res.**, v.6, p.1169-1177, 2007.

MOUTRAN, A.; QUAGGIO, R.B.; BALAN, A.; FERREIRA, L.C.S.; FERREIRA, R.C.C. The oligopeptide permease (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Curr Microbiol.**, v.48, p.354-359, 2004.

NCBI NATIONAL CENTER OF BIOINFORMATICS. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 1 set. 2004.

NEIDHARDT, F.C.; BLOCH, P.L.; SMITH, D.F. Culture medium for enterobacteria. **J. Bacteriol.**, v.119, p.736-747, 1974.

NEPOMUCENO, R.S.; TAVARES, M.B.; LEMOS, J.A.; GRISWOLD, A.R.; RIBEIRO, J.L.; BALAN, A.; GUIMARÃES, K.S.; CAI, S.; BURNE, R.A.; FERREIRA, L.C.; FERREIRA, R.C. The oligopeptide (opp) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence, and characterization. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.22, n.4, p.277-284, 2007.

NEUBAUER, H.; PANTEL, I.; LINDGREN, P.E.; GÖTZ, F. Characterization of the molybdate transport system ModABC of *Staphylococcus carnosus*. **Arch. Microbiol.**, v.172, n.2, p.109-115, 1999.

NEVES, M.F.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S.; NEVES, M.F. Citricultura brasileira: efeitos econômicos-financeiros, 1996-2000. **Ver. Bras. Fruct.**, v.23, p.432-436, 2001.

NOGALES, J.; MUÑOZ, S.; OLIVARES, J.; SANJUÁN, J. Genetic

characterization of oligopeptide uptake systems in *Sinorhizobium meliloti*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.293, p.177-187, 2009.

ORCHARD, S.S.; GOODRICH-BLAIR, H. Identification and functional characterization of a *Xenorhabdus nematophila* oligopeptide permease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, n.9, p.5621-5627, 2004.

OSHIRO, E.E.; NEPOMUCENO, R.S.L.; FARIA, J.B.; FERREIRA, L.S.; FERREIRA, R.C.C. Site-directed gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas citri*. **J. Microbiol. Methods.**, v.26, p.171-179, 2006.

PARKINSON, N.; ARITUA, V.; HEENEY, J.; COWIE, C.; BEW, J.; STEAD, D. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial *gyr*ase B gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.57, p.2881-2887, 2007.

PEREGO, M.; HIGGINS, C.F.; PEARCE, S.R.; GALLAGHER, M.P.; HOCH, J.A. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. **Mol. Microbiol.**, v.5, n.1, p.173-185, 1991.

PRENTKI, P.; KRISCH, H.M. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, v.3, n.29, p.303-313, 1984.

PROGRAMA DE ESTUDOS DOS NEGÓCIOS DO SISTEMA AGROINDUSTRIAL. Disponível em: <<http://www.fundacofia.com.br/pensa>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S.X.; HE, Y.Q.; FENG, J.X.; LU, L.F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D.J.; TANG, H.; WU, W.; HAO, P.; WANG, L.; JIANG, B.L.; ZENG, S.; GU, W.Y.; LU, G.; RONG, L.; TIAN, Y.; YAO, Z.; FU, G.; CHEN, B.; FANG, R.; QIANG, B.; CHEN, Z.; ZHAO, G.P.; TANG, J.L.; HE, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Res.**, v.15, n.6, p.757-767, 2005.

RECH, S.; DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS, R.P. Regulation of the molybdate transport operon *modABCD*, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. **J. Bacteriol.**, v.177,

n.4, p.1023-1029, 1995.

RECH, S.; WOLIN, C.; GUNSALUS, R.P. Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.5, p.2557-2562, 1996.

REES, D.C. Great metalloclusters in enzymology. **Annu. Rev. Biochem.**, v.71, p.221-246, 2002.

RIGANO, L.A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.S.; QÜESTA, J.; DOW, J.M.; CASTAGNARO, A.P.; VOJNOV, A.A.; MARANO, M.R. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.20, n.10, p.1222-1230, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. v.1, 417 p.

ROSENTEL, J.K.; HEALY, F.; MAUPIN-FURLLOW, J.A.; LEE, J.H.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate and regulation of mod (molybdate transport), *fdhF*, and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.177, n.17, p.4857-4864, 1995.

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.; MADUPU, R.; PUIU, D.; RADUNE, D.; SHUMWAY, M.; TRAPNELL, C.; APARNA, G.; JHA, G.; PANDEY, A.; PATIL, P.B.; ISHIHARA, H.; MEYER, D.F.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; KOEBNIK, R.; DOW, J.M.; RYAN, R.P.; HIRATA, H.; TSUYUMU, S.; WON LEE, S.; SEO, Y.S.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.C.; SONTI, R.V.; VAN SLUYS, M.A.; LEACH, J.E.; WHITE, F.F.; BOGDANOVE, A.J. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. **BMC. Genomics**, v.9, n.204, p.1-16, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K.

Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.29, n.8, p.690-695, 2006.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.28, p.494-518, 2005. Published erratum appears in *Syst. Appl. Microbiol.*, v.29, n.8, p.690-695, 2006

SCHWARZ, G. Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. **Cell Mol. Life Sci.**, v.62, n.23, p.2792-2810, 2005.

SELF, W.T.; GRUNDEN, A.M.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate transport. **Res. Microbiol.**, v.152, n.3-4, p.311-321, 2001.

SICILIANO, F.; TORRES, P.; SENDIN, L.; BERMEJO, C.; FILIPPONE, P.; VELLICE, G.; RAMALLO, J.; CATAGNARO, A. Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* pathogenesis in *Citrus limon*. **Eletron. J. Biotechnol.**, v.9, p.200-204, 2006.

SNYDER, L. E CHAMPNESS, W. Elementos móveis. In: **Molecular Genetics of bacteria**. Washington, D.C.: ASM Press, 2003.

SOUZA, L.C.; WULFF, N.A.; GAURIVAUD, P.; MARIANO, A.G.; VIRGÍLIO, A.C.; AZEVEDO, J.L.; MONTEIRO, P.B. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC *gumB* and *gumF* genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.257, n.2, p.236-242, 2006.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J Ultrastruct Res.**, v.26, n.1, p.31-43, 1969.

STEMPAK, J.G.; WARD, R.T. An improved staining method for electron microscopy. **J Cell Biol.**, v.22, p.697-701, 1964.

TAME, J.R.; DODSON, E.J.; MURSHUDOV, G.; HIGGINS, C.F.; WILKINSON, A.J. The crystal structures of the oligopeptide-binding protein OppA complexed with tripeptide and tetrapeptide ligands. **Structure**, v.3, n.12, p.1395-1406, 1995.

TANG, J.L., LIU, Y.N., BARBER, C.E., DOW, J.M., WOOTTON, J.C., AND DANIELS, M.J. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Mol. Gen. Genet.**, v.226, p.409-417, 1991.

TAYLOR, D.L.; WARD, P.N.; RAPIER, C.D.; LEIGH, J.A.; BOWLER, L.D. Identification of a differentially expressed oligopeptide binding protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by representational difference analysis of cDNA. **J. Bacteriol.**, v.185, n.17, p.5210-5219, 2003.

TEJADA-JIMÉNEZ, M.; LLAMAS, A.; SANZ-LUQUE, E.; GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E. A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.104, n.50, p.20126-20130, 2007.

THIEL, T.; PRATTE, B.; ZAHALAK, M. Transport of molybdate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **Arch. Microbiol.**, v.179, n.1, p.50-56, 2002.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; KAY, S.; KIRCHNER, O.; LANZ, C.; LINKE, B.; MCHARDY, A.C.; MEYER, F.; MITTENHUBER, G.; NIES, D.H.; NIESBACH-KLÖSGEN, U.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; SCHUSTER, S.C.; VORHÖLTER, F.J.; WEBER, E.; PÜHLER, A.; BONAS, U.; BARTELS, D.; KAISER, O. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by

the complete genome sequence. **J. Bacteriol.**, v.187, n.21, p.7254-7266, 2005.

TSUHAKO, M. H.; FERREIRA, L. C.; COSTA, S. O. P. OppA *Escherichia coli* mutants have osmodependent resistance to aminoglycoside antibiotics. **Genet. Mol. Biol.**, v.21, n.1, p.15-19, 1998.

VEITH, P.D.; DASHPER, S.G.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; PAOLINI, R.A.; ORTH, R.; WALSH, K.A.; REYNOLDS, E.C. Major proteins and antigens of *Treponema denticola*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1794, n.10, p.1421-1432, 2009.

VOJNOV, A.A.; ZORREGUIETA, A.; DOW, J.M.; DANIELS, M.J.; DANKERT, M.A. Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, v.144, n.6, p.1487-1493, 1998.

VORHÖLTER, F.J.; SCHNEIKER, S.; GOESMANN, A.; KRAUSE, L.; BEKEL, T.; KAISER, O.; LINKE, B.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; SCHMID, J.; SIDHU, V.K.; SIEBER, V.; TAUCH, A.; WATT, S.A.; WEISSHAAR, B.; BECKER, A.; NIEHAUS, K.; PÜHLER, A. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. **J. Biotechnol.**, v.134, p.33-45, 2008.

WANG, G.; ANGERMÜLLER, S.; KLIPP, W. Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. **J. Bacteriol.**, v.75, n.10, p.3031-3042, 1993.

WANG, X.G.; KIDDER, J.M.; SCAGLIOTTI, J.P.; KLEMPNER, M.S.; NORING, R.; HU, L.T. Analysis of differences in the functional properties of the substrate binding proteins of the *Borrelia burgdorferi* oligopeptide permease (Opp) operon. **J. Bacteriol.**, v.186, n.1, p.51-60, 2004.

WANNER, C.; SOPPA, J. Genetic identification of three ABC transporters as essential elements for nitrate respiration in *Haloferax volcanii*. **Genetics**, v.152, n.4, p.1417-1428, 1999.

WEINBERG, M.V.; MAIER, R.J. Peptide transport in *Helicobacter*

*pylori*: roles of *dpp* and *opp* systems and evidence for additional peptide transporters. **J. Bacteriol.**, v.189, n.9, p.3392-3402, 2007.

WENGELNIK, K.; MARIE, C.; RUSSEL, M.; BONAS, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **J. Bacteriol.**, v.178, n.4, p.1061-1069, 1996a.

WENGELNIK, K.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.9, n.8, p.704-712, 1996b.

WILLIAMS, R.J.; FRAÚSTO DA SILVA, J.J. The involvement of molybdenum in life. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.292, n.2, p.293-299, 2002.

ZAHALAK, M.; PRATTE, B.; WERTH, K.J.; THIEL, T. Molybdate transport and its effect on nitrogen utilization in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **Mol. Microbiol.**, v.51, n.2, p.539-549, 2004.

ZAIJUN, L.; JIAOMAI, P.; JIAN, T. Determination of trace molybdenum in vegetable and food samples by spectrophotometry with p-carboxyphenylfluorone. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.374, n.6, p.1125-1131, 2002.