

农杆菌 T-复合物招募蛋白的发现 和生物学功能鉴定

郭敏亮

(扬州大学 生物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

摘要: 农杆菌是一种能使部分双子叶植物发生冠瘿瘤病害的病原菌,其致病机理是从自身的 Ti 质粒上转运一段 T-DNA 到宿主细胞中,并使宿主细胞发生遗传转化。农杆菌是以蛋白质-单链-T-DNA 复合物(简称 T-复合物)的形式来转运这段 T-DNA。T-复合物是通过四型分泌系统(T4SS)转运到宿主细胞中,T-复合物与 T4SS 之间的识别是由一种被称为 T-复合物招募蛋白的蛋白质来完成的。将对农杆菌 T-复合物招募蛋白的发现过程和生物学功能鉴定方面的研究进展进行简要评述。

关键词: 农杆菌; T-DNA; T-复合物招募蛋白; 四型分泌系统

中图分类号: Q936; Q75 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0992-05

Discovery and Biological Function Identification of *Agrobacterium* T-complex recruiting Protein

GUO Min-liang

(College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou City 225009, China)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens* is a phytopathogenic bacterium that causes the crown gall tumor disease in some dicotyledonous plants by transferring a segment of DNA (T-DNA) from its Ti-plasmid to plant cells and genetically transforming the host cells. *Agrobacterium* transfers the T-DNA in the form of protein-single-stranded-T-DNA (called T-complex). T-complex is transferred to the host cell through the type IV secretion system (T4SS). The recognition between T-complex and T4SS is fulfilled by a T-complex recruiting protein. This paper will briefly review the discovery of the *Agrobacterium* T-complex recruiting protein and the progress in identifying the biological function of the *Agrobacterium* T-complex recruiting protein.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; T-DNA; T-complex recruiting protein; type IV secretion system

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的 T-DNA 转运技术是目前使用最广泛的一种植物转基因技术^[1-4],该技术的基本原理是利用农杆菌可以把它的 Ti 质粒上的一段 DNA(人们称之为 T-DNA)

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(30870054)、人力资源社会保障部“高层次留学人才回国工作资助计划”和教育部留学回国人员科研启动基金资助

作者简介: 郭敏亮(1964—),男,江西于都人,博士,教授。1985年本科毕业于江西农业大学农学系;1988年在江苏农学院获硕士学位;1998—1999年获澳大利亚 Monash 大学资助在该校做荣誉访问科学家;2001—2005在新加坡国立大学攻读博士学位,并获哲学博士学位;2006—2007年任新加坡国立大学生物科学系研究员。2007年回扬州大学工作。以第一作者在《PNAS》、《MPMI》等高影响因子的重要学术期刊累计发表论文近 40 篇,其中被 SCI 收入的论文 9 篇。获得资助的项目有:国家自然科学基金(30870054)、人力资源与社会保障部“高层次留学人才回国工作资助计划”、教育部留学回国人员科研启动基金和江苏省重点实验室开放课题。主要研究领域为酶的蛋白质工程和微生物功能基因。E-mail: guoml@yzu.edu.cn。

转运到宿主细胞核中,并整合到宿主细胞的基因组中进行表达^[2,5-7]。在自然界中,农杆菌只能将其 T-DNA 转给某些双子叶植物,而使这些双子叶植物宿主出现冠瘿瘤病害(crown gall tumor disease),因而在自然条件下农杆菌实际上是一种双子叶植物的病原菌^[1-2,7]。在人工条件下,人们可以把 Ti 质粒上的 T-DNA 片段替换成外源目的基因片段,这样农杆菌就能把外源的目的基因片段转运到宿主细胞中,从而使宿主细胞发生遗传转化^[1-2,5]。同时,在人工条件下农杆菌的宿主早已不只是少数几种双子叶植物,其宿主不仅扩展到单子叶植物^[8],还扩展到酵母^[9]、真菌^[10]和哺乳动物细胞^[11]。因此,农杆菌被人们称为自然界中的“天然遗传工程师”^[12]。

农杆菌介导的 T-DNA 转移是一个非常复杂的生物学过程,整个过程可分成下面几个阶段^[5]:第 1 阶段,T-DNA 转运的启动阶段。农杆菌能够感受由受伤宿主细胞分泌的信号物质,这些信号物质主要是一些酚类和糖类物质。当农杆菌感受到这些信号物质后就开始启动与 T-DNA 转运有关的基因进行表达,合成相应的蛋白质,这些与 T-DNA 转运有关的蛋白质通称为致毒蛋白(virulence protein)^[13]。第 2 阶段,T-复合物的形成阶段。农杆菌转运 T-DNA 是以蛋白质-T-DNA 复合物的形式来实现的,这个被转运的蛋白质-T-DNA 复合物被称为 T-DNA 复合物,或简称为 T-复合物(T-complex)。T-复合物的产生是由一种叫 VirD2 的致毒蛋白来完成的,VirD2 蛋白具有核酸内切酶活性,但只能切割双链 DNA 中的一条链,因此 VirD2 蛋白又被称为切割酶(nickase)或松弛酶(relaxase)^[14]。VirD2 从 Ti 质粒上切下一条单链的 T-DNA,并且通过共价键连在 T-DNA 的 5' 末端形成 VirD2-T-DNA 复合物。在 T-DNA 转运过程中的某些阶段,另一致毒蛋白 VirE2 可能覆盖整个单链 T-DNA 以保护其不被降解,在这些转运阶段,T-复合物就变成 1 个由 VirD2、单链 T-DNA 和许多 VirE2 分子构成的更大的复合物^[15-18]。第 3 阶段,T-复合物的转运阶段。在农杆菌细胞中形成的 T-复合物是通过农杆菌细胞两端的四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)转运到宿主细胞^[19-21]。农杆菌的 T4SS 是农杆菌细胞向外转运大分子物质的重要通道,T4SS 不仅能转运 T-复合物,还能转运多种蛋白质和部分能够进行接合转移的质粒^[22-24]。由于 T4SS 能转运这么多不同的底物,因此,T4SS 与待转运的底物之间一定存在识别机制^[20,25]。第 4 阶段,T-复合物在宿主细胞中的转运以及 T-DNA 与宿主基因组的整合、表达^[26-28]。T-复合物进入宿主细胞后,在宿主相关蛋白的帮助下转运进入细胞核,并将 T-DNA 整合到宿主的基因组中,如果 T-DNA 整合的位点合适,T-DNA 上所携带的基因就可以在宿主中表达^[27,29-32]。

由上面的简要叙述可以看出:T-DNA 的转运是一个非常复杂的过程,参与此过程的蛋白很多,有些蛋白的功能比较明确,例如,现已知道 VirD2 蛋白既是把 T-DNA 从 Ti 质粒上切割下来的酶,又是引导 T-复合物转运的领航蛋白(pilot protein),参与了整个 T-DNA 的转运过程^[5,14]。但相当多的蛋白的功能还不够明确,当然也可能还有一些未知蛋白参与了这个过程。由于农杆菌 T-DNA 转运机理的复杂性和文章篇幅的限制,因此在这里我只想就其中的一个环节的研究进展情况做一些介绍,主要阐述农杆菌细胞内的 T-复合物是如何找到和聚集到细胞两端的四型分泌系统(T4SS)处。

1 农杆菌 VirD2 结合蛋白的发现及其与 T-DNA 转运的关系

1.1 农杆菌 VirD2 结合蛋白的发现

笔者将 VirD2 蛋白基因融合到麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)基因的 3' - 末端,用大肠杆菌表达出 MBP-VirD2 融合蛋白,MBP-VirD2 融合蛋白的 MBP 部分可以与固体的淀粉凝胶颗粒结合,然后以结合在淀粉凝胶上的 MBP-VirD2 融合蛋白为亲和配基,从农杆菌的提取液中寻找能够与 VirD2 结合的蛋白,结果找到了一种新的能与 VirD2 结合的蛋白,通过多种方法反复验证该蛋白与 VirD2 的结合是专一性的^[33]。将这种蛋白的胰蛋白酶水解指纹图谱与数据库中的蛋白质的胰蛋白酶水解指纹图谱比较,发现该蛋白是由农杆菌基因组中的开放阅读框(open read frame, ORF)预测的蛋白,没有任何人分离鉴定过该蛋白,说明由基因组序列预测的这个开放阅读框(ORF)在农杆菌中可以表达出有一定生物学功能的蛋白。同源性分析结果显示这种蛋白是一个高度保守的蛋白,在农杆菌中就有 3 个拷贝的同源基因,分别在 At 质粒和线形染色体上,其中在线形染色体中有 2 个同源基因,这 2 个同源基因位置很近且与质粒接合有关的基因排列在一起^[33]。由于农杆菌的 T-DNA 转运与细菌的质粒接

合(plasmid conjugation)在进化上有一定的关系^[34-35],因此认为这种能与 VirD2 专一性结合的新蛋白,可能参与 T-DNA 的转运,决定对该蛋白做进一步的研究。

此外,很多微生物中都含有该蛋白的同源基因,不过人们同样不知道这些微生物中的同源基因是否能表达出有功能的蛋白。所以,认为这是一种新蛋白,将该蛋白取名为农杆菌 VirD2 结合蛋白(VirD2-binding protein,缩写为 VBP)^[33]。

1.2 VBP 蛋白的结构特征

VBP 是一个高度保守的蛋白,数据库中 VBP 同源蛋白的氨基酸序列信息比较丰富,为此我们对 VBP 蛋白的结构情况做了一些分析和预测。预测结果显示农杆菌 VBP 蛋白含有两个结构域,一个是存在于 N-末端的核苷转移酶(nucleotidyltransferase,NT)结构域,另一个是存在于 C-末端的高等真核和原核生物核苷酸结合(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding,HEPN)结构域,利用 PCR 定点突变的方法分别对两个结构域的部分保守氨基酸进行定点突变,结果显示,HEPN 结构域直接影响 VBP 与 VirD2 的相互作用,而 NT 结构域似乎与 VirD2 的结合关系不大。这些结果表明 VBP 中的这两个结构域可能具有相对独立的功能^[33]。

1.3 VBP 蛋白与农杆菌致瘤的关系

为了证明 VBP 与农杆菌 T-DNA 转运的关系,我们采用了人们熟悉的反遗传的方法,也就是将农杆菌中所有的 *vbp* 基因敲除掉(或使它们失去功能),这样就可以得到不含 *vbp* 基因的农杆菌突变体^[36],通过比较这种突变体和野生型农杆菌在致瘤方面的差别,就可以确定 VBP 与农杆菌 T-DNA 转运之间的关系。笔者的研究结果显示不含 *vbp* 基因的农杆菌突变体的致瘤能力明显降低,说明 VBP 确实与 T-DNA 的转运有关^[33]。

2 VBP 蛋白是一种 T-复合物招募蛋白

2.1 VBP 蛋白使 T-复合物聚集到 T4SS 附近

尽管 VBP 与农杆菌 T-DNA 转运(实际上是致瘤)的关系已经明确,但 VBP 到底参与了 T-DNA 转运过程中的哪一步呢?具体是起什么作用呢?对这个问题的进一步解决实际上比前面证明 VBP 影响 T-DNA 转运更重要,因为农杆菌的 T-DNA 转运是一个非常复杂的过程^[2,5-6],只知道 VBP 与 T-DNA 转运有关,而不知道 VBP 如何影响 T-DNA 转运,实际上只是提出了一个新问题,根本还没有解决这个问题。为了探讨 VBP 影响 T-DNA 转运的机理,笔者首先想到的就是确定 VBP 是否还能与其它已经明确参与 T-DNA 转运的蛋白发生相互作用,用 VBP 蛋白去结合农杆菌提取液,结果发现,VBP 不仅能够结合 T-DNA 复合物,也能结合四型分泌系统(type IV secretion system,T4SS)的某些蛋白^[37],这个结果为笔者进一步研究 VBP 影响 T-DNA 转运的机理提供了很大的帮助。因为现有的研究结果已经证明 T-DNA 是通过 T4SS 转运到细胞外的^[19-20,23],由此猜测 VBP 可能起着把 T-DNA 复合物介绍到 T4SS 中的中介作用。这只是一种猜测,那么能不能找到合适的方法来证明这一猜测是不是对的。

为了证明这种猜测,我们将绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)与 VBP 融合,构建 GFP-VBP 融合蛋白,通过观察 GFP-VBP 的荧光来确定 VBP 在农杆菌细胞内的定位。结果发现,GFP-VBP 荧光出现在农杆菌细胞的两端,而把未与 VBP 融合的 GFP 引入农杆菌细胞时,GFP 荧光却均匀地分布在整個细胞内,这说明 VBP 能把融合到其上面的 GFP 带到细胞的两端^[37]。农杆菌中转运 T-复合物的通道是 T4SS,T4SS 是分布在农杆菌细胞的两端^[21-22],那么 GFP-VBP 荧光出现在农杆菌细胞两端的这种现象和 T4SS 是否有关呢?用农杆菌的 T4SS 突变体的观察实验证明两者是相关的。由于 VirD2 是 T-复合物中的一个重要蛋白,VirD2 参与了 T-DNA 转运的整个过程,是 T-复合物转运的领航蛋白,然而 VirD2 却不能单独与 T4SS 的门户蛋白 VirD4 发生相互作用^[25,33],也就是说单独的 VirD2 是很难找到 T-复合物的转运通道 T4SS,应该是需要其它蛋白的帮助,而 GFP-VBP 融合蛋白的观察结果说明,VBP 可以聚集到 T4SS 附近,因此笔者很自然地就想到 VBP 是否能把 VirD2 引到 T4SS 上,因为 VBP 能专一性地结合 VirD2。

为了观察 VBP 是否能把 VirD2 带到 T4SS 上,我们把 GFP 融合到 VirD2 上,然后把这种 GFP-VirD2 融合蛋白引入到相关的农杆菌突变体中,观察 GFP-VirD2 荧光在这些农杆菌突变体细胞中的分

布情况,结果发现,在没有 VBP 的突变体细胞中,大约有 95% 的细胞表现为荧光均匀地分布在整个细胞中,只有 5% 左右的细胞显示,荧光出现在细胞的两端;而在含有 VBP 的细胞中,有超过 55% 的细胞,其荧光出现在细胞的两端,这就证明了 VBP 能够把 GFP-VirD2 招募到 T4SS 上。由于 VBP 也能结合完整的 T-复合物,而在 T-复合物中 VirD2 是领航蛋白,因此可以得出,VBP 可以把 T-复合物招募到 T4SS 上,于是笔者将 VBP 定义为一类参与 T-DNA 转运的新蛋白——“招募蛋白”(recruiting protein)^[37]。

2.2 VBP 蛋白与质粒接合的关系

由于 T-DNA 的转运和质粒的接合在进化上有着明显的相互关系,而且有相当多的质粒接合也是通过 T4SS 来实现的。在农杆菌中已经证明 Inc Q 这类质粒就是通过 T4SS 进行接合的^[38],这就很容易想到 VBP 既然能把农杆菌中的 T-复合物招募到 T4SS 上,那么 VBP 是否也能把质粒接合过程中待转运的质粒 T-复合物招募到 T4SS 上呢?同时,VBP 的同源性分析结果也说明 VBP 是一个高度保守的蛋白,很多微生物都含有 VBP 同源蛋白,那么这些微生物中的 VBP 同源蛋白是否也具有招募 T-复合物的功能呢?实验结果显示,在农杆菌中,Inc Q 这类以 T4SS 为转运通道的质粒的接合确实是明显地受 VBP 的影响,而其它不以 T4SS 为转运通道的质粒(如 Inc P)的接合则不受 VBP 的影响。这说明“招募蛋白”不仅在农杆菌的 T-DNA 转运中存在,而且在微生物中广泛存在的质粒接合过程中也存在“招募蛋白”,也就是说 T-复合物“招募蛋白”具广泛的普遍意义^[37],而不是农杆菌 T-DNA 转运中特有的个案。

3 需要进一步研究的问题

尽管已经有多方面充分的实验数据说明,VBP 在农杆菌 T-DNA 转运过程中起着把 T-复合物招募到 T4SS 上的作用,同时也有数据证明在农杆菌中某些质粒的接合也需要 VBP。但是,仍需要更多的其它微生物质粒接合的数据来说明“招募蛋白”在其它微生物的质粒接合中也起着重要作用。此外,VBP 招募 T-复合物的生物化学机理也是需要进一步解决的重要问题,因为 VBP 是一种由基因组中开放阅读框(ORF)推测出来的假设蛋白,有关其结构域的分析也只是一种预测结果,对于其生物化学特性,到目前为止还是一无所知^[33,37]。因此,确定 VBP 是否具有所预测的核苷转移酶活性将是下一步研究的重点之一。

参考文献:

- [1] Rao A Q, Bakhsh A, Kiani S, et al. The myth of plant transformation [J]. *Biotechnology Advances* 2009 27: 753-763.
- [2] Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: Biology and biotechnology [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17: 147-154.
- [3] 陈英, 黄敏仁, 王明麻. 植物遗传转化新技术和新方法 [J]. *中国生物工程杂志* 2005 25(9): 94-98.
- [4] 叶兴国, 王艳丽, 丁文静. 主要农作物转基因研究现状和展望 [J]. *中国生物工程杂志* 2006 26(5): 93-100.
- [5] 郭敏亮, 高佃坤, 金英善. 农杆菌 T-复合物的形成与转运研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(11): 1408-1414.
- [6] Zhan Y, Zeng F, Xin Y. Progress on molecular mechanism of T-DNA transport and integration [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005 32(6): 655-665.
- [7] McCullen C A, Binns A N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006 22: 101-127.
- [8] Shrawat A K, Lorz H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: A promising approach crossing barriers [J]. *Plant Biotechnology Journal* 2006 4: 575-603.
- [9] Piers K L, Heath J D, Liang X, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996 93: 1613-1618.
- [10] Michielse C B, Hooykaas P J J, van den Hondel C A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi [J]. *Curr Genet* 2005 48: 1-17.
- [11] Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, et al. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001 98: 1871-1876.
- [12] Lacroix B, Tzfira T, Vainstein A, et al. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners [J].

- TRENDS in Genetics 2006 22: 29 – 37.
- [13] Gelvin S B. *Agrobacterium* virulence gene induction [J]. Methods Mol Biol 2006 343: 77 – 84.
- [14] Stachel S E , Timmerman B , Zambryski P. Generation of single – stranded T – DNA molecules during the initial stages of T – DNA transfer for *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells [J]. Nature 1986 322: 706 – 712.
- [15] Christie P J , Ward J E , Winans S C , et al. The *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 gene product is a single – stranded – DNA – binding protein that associates with T – DNA [J]. J Bacteriol 1988 170: 2659 – 2667.
- [16] Grange W , Duckely M , Husale S , et al. VirE2: A unique ssDNA – compacting molecular machine [J]. PLoS Biol 2008 6 (2) : 44.
- [17] Frenkiel – Krispin D , Wolf S G , Albeck S , et al. Plant transformation by *Agrobacterium tumefaciens*: Modulation of single – stranded DNA – VirE2 complex assembly by VirE1 [J]. J Biol Chem 2007 282(6) : 3458 – 3464.
- [18] Dym O , Albeck S , Unger T , et al. Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1 – VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2008 105(32) : 11170 – 11175.
- [19] Chen I , Christie P J , Dubnau D. The ins and outs of DNA transfer in bacteria [J]. Science 2005 310: 1456 – 1460.
- [20] Lia J , Wolf S G , Elbaume M , et al. Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems [J]. Trends Microbiol 2005 13(7) : 295 – 298.
- [21] Judd P K , Kumar R B , Das A. Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* typ IV secretion apparatus [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2005 102(32) : 11498 – 11503.
- [22] Atmakuri K , Ding Z , Christie P J. VirE2 , a type IV secretion substrate , interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Mol Microbiol 2003 49(6) : 1699 – 1713.
- [23] Juhas M , Crook D W , Hood D W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence [J]. Cellular Microbiology 2008 10(12) : 2377 – 2386.
- [24] Backert S , Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis [J]. Cell Microbiol 2008 10(8) : 1573 – 1581.
- [25] Cascales E , Christie P J. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate [J]. Science 2004 304 (5674) : 1170 – 1173.
- [26] Dafny Yelin M , Levy A , Tzfira T. The ongoing saga of *Agrobacterium*–host interactions [J]. Trends Plant Sci 2008 13(3) : 102 – 105.
- [27] Djamei A , Pitzschke A , Nakagami H , et al. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: Abusing MAPK defense signaling [J]. Science 2007 318: 453 – 456.
- [28] Citovsky V , Kozlovsky S V , Lacroix B , et al. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection [J]. Cellular Microbiology 2007 9(1) : 9 – 20.
- [29] Gelvin S B. Finding a way to the nucleus [J]. Curr Opin Microbiol 2010 13: 53 – 58.
- [30] Lacroix B , Li J , Tzfira T , et al. Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell [J]. Can J Physiol Pharmacol 2006 84(3/4) : 333 – 345.
- [31] Anand A , Krichevsky A , Schornack S , et al. Arabidopsis VIRE2 INTERACTING PROTEIN2 is required for *Agrobacterium* T-DNA integration in plants [J]. Plant Cell 2007 19(5) : 1695 – 1708.
- [32] Lacroix B , Loyer A , Citovsky V. Association of the *Agrobacterium* T-DNA–protein complex with plant nucleosomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2008 105(40) : 15429 – 15434.
- [33] Guo M , Hou Q , Hew C L , et al. *Agrobacterium* VirD2 – binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters [J]. Molecular Plant – Microbe Interactions 2007 20: 1201 – 1212.
- [34] Christie P J. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems [J]. Biochim Biophys Acta , 2004 1694(1/2/3) : 219 – 234.
- [35] Christie P J , Atmakuri K , Krishnamoorthy V , et al. Biogenesis , architecture , and function of bacterial type IV secretion systems [J]. Annu Rev Microbiol 2005 59: 451 – 485.
- [36] Guo M , Zhu Q , Gao D. Development and optimization of method for generating unmarked *A. tumefaciens* mutants [J]. Prog Biochem Biophys 2009 36(5) : 556 – 565.
- [37] Guo M , Jin S , Sun D , et al. Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2007 104: 20019 – 20024.
- [38] Chen L , Chen Y , Wood D W , et al. A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. J Bacteriol 2002 184: 4838 – 4845.