

文章编号: 1001-1498(2001)03-0258-07

# 根癌农杆菌对感染植原体的泡桐 组培苗症状的影响\*

田国忠<sup>1</sup>, 朱水芳<sup>2</sup>, 罗飞<sup>1</sup>, 李怀方<sup>3</sup>, 裘维蕃<sup>3</sup>

(1. 中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所, 北京 100091;

2. 农业部 植物检疫实验所, 北京 100029; 3. 中国农业大学 植物保护学院, 北京 100094)

**摘要:** 采用含有激素合成相关基因的根癌农杆菌, 伤口接种已感染植原体的泡桐丛枝组培苗和健康组培苗, 结果发现对丛枝苗的致瘤能力明显低于健康对照苗, 且被接种病苗的丛枝症状缓解。从健苗获得的 T-DNA 转化泡桐瘤组织细胞能在无激素培养基上稳定生长和连续继代培养 2 年以上, 说明瘤组织细胞自身已获得了细胞分裂素和生长素合成能力。根据已报道的根癌农杆菌株系 pTil 5955 T-DNA 的异戊烯基转移酶基因(*ipt*) 的保守序列, 设计了一对引物(CYT 和 CYT'), 用多聚酶链式反应(PCR)扩增了我国杨树致瘤农杆菌 *ipt* 基因部分序列(427 bp 片段), 也从遗传转化的两个泡桐无性系瘤组织 At-ZH 和 At-T 35 扩增出此特异片段, 从而进一步肯定了 T-DNA 已被整合到泡桐的染色体上, 表明泡桐易于通过 T<sub>i</sub> 质粒载体途径进行基因转移操作, 但用此引物未能从泡桐、甘薯健株和感染植原体的组培病苗扩增出相应的 427 bp 特异片段。当用此遗传转化瘤组织嫁接病苗时, 可减轻丛枝症状的严重程度, 延长病苗的存活时间和诱导病株生根, 这进一步证实了泡桐在与植原体相互作用过程中激素代谢发生了变化。

**关键词:** 根癌农杆菌; 泡桐丛枝病植原体; 病害症状; 异戊烯基转移酶基因(*ipt*); 多聚酶链式反应(PCR)

中图分类号: S718.83

文献标识码: A

由植原体侵染引起的泡桐(*Paulownia* spp.) 丛枝症状, 涉及病株体内激素代谢的紊乱, 其中生长素和细胞分裂素所起的作用已引起关注<sup>[1-3]</sup>。但受植原体病原尚不能人工培养等困难, 使与致病相关的分子生物学研究进展较慢。现在, 已知多种病原微生物含有控制生长素和细胞分裂素合成的基因, 特别是对根癌农杆菌[*Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn] T-DNA 上与生长素和细胞分裂素合成相关的基因克隆及转化植株研究, 证明了其在病菌致瘤过程中的关键作用<sup>[4,5]</sup>。根癌农杆菌侵染杨树(*Populus* spp.) 引起茎部和根部肿瘤症状<sup>[6]</sup>, 将这种含致瘤基因的 T-DNA 整合到毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.) 染色体上后可使激素合成基因得以表达<sup>[7,8]</sup>。Haas 等<sup>[9]</sup>根据根癌农杆菌 T-DNA 的碱基序列设计了一对引物 CYT 和 CYT', 可扩增细菌的异戊烯基转移酶基因(*ipt*) 片段。异戊烯基转移酶催化二甲基丙

收稿日期: 2000-08-25

基金项目: 国家林业局森林保护学重点实验室基金资助项目(1998~2000)

作者简介: 田国忠(1963-), 男, 山东莒县人, 副研究员, 博士。

\* 本研究得到中国林科院刘惠珍、张锡津先生, 中国农科院生物技术中心李汝刚博士, 农业部植物检疫实验所张作芳、张成良老师、黄文胜和吴志明等同志的帮助, 特此致谢。

烯焦磷酸酯与腺苷单磷酸合成N-( $\Delta^2$ -异戊烯基)腺苷5-磷酸,此为细胞分裂素合成的关键步骤。

本试验探讨了用杨树致瘤根癌农杆菌株接种感染植原体的丛枝和健康泡桐组培苗上对病害症状和泡桐生长的影响,以深入了解植原体对泡桐的致病作用机制。同时,采用此致病根癌农杆菌遗传转化泡桐组培苗,研究根癌农杆菌T-DNA遗传转化泡桐的可行性和转化组织特性,以期为开展泡桐基因转移打下良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 感染植原体的泡桐丛枝组培苗和健康组培苗

植原体分离物来自山东兖州,保存在毛泡桐[*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud]无性系C85-028上,引致典型的丛枝症状<sup>[1]</sup>,将此分离物称之为C85-028D。另外2个感染植原体的无性系为C85-034D和Q4D,用C85-028D病组培苗经温度处理和茎尖培养结合处理获得的脱毒苗为T35-028。中林3号泡桐[*P. elongata* S. Y. Hu  $\times$  *P. fortunei* (Seem.) Hemsl.]组培苗来自北京中国林科院内成年树,健株编号为ZH-3,感染植原体后的丛枝病苗编号为ZD。感染植原体的甘薯丛枝病(*Phytoplasma* sp.)组培苗和健康对照由中国农科院植物保护所何放亭惠赠。

泡桐组培苗和转化组织培养基包括MS基础培养基和愈伤组织诱导培养基(MS+ 4.5 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 6-BA+ 0.2 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NAA)和不定芽分化培养基(MS+ 2 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 6-BA+ 0.2 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NAA)。

### 1.2 杨树根癌农杆菌株

*Agrobacterium tumefaciens* CFCC1001株系由国家林业局林木菌种保藏中心提供,能引致杨树及其它木本植物根茎部肿瘤<sup>[6]</sup>,用YEB琼脂培养基培养。

含构建重组质粒的对照农杆菌AT-GUS和AT-TH分别携带GUS报道基因和与抗病相关的Harpin<sub>Ea</sub>基因,由中国农科院生物技术中心李汝刚先生惠赠,用含卡那霉素和利福平的YEB培养基培养。

### 1.3 野生致瘤型 *Agrobacterium tumefaciens* 接种处理组培苗和转化泡桐组织

用具柄的无菌解剖刀直接挑取菌落,涂于组培苗茎部的切口上(包括去顶切口和未去顶的伤口),于正常光照下培养,30 d左右切取伤口长出的愈伤瘤组织于含1 000  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>羧苄青霉素的MS培养基中光照培养,每隔20~30 d转移至相同的新培养基上连续继代1~4次。最后挑取无菌转化瘤组织,切成5 mm左右的小块在不含激素和抗生素的MS培养基上1~2月继代培养1次。

### 1.4 根癌农杆菌转化瘤组织嫁接病、健组培苗

在组培苗的主茎的不同部位向下斜切0.1~0.2 cm深度的切口,将转化瘤组织切成约1 mm的小片,夹持在切口内,然后光照培养。

### 1.5 *ipt* 引物的设计和PCR扩增

设计并合成的一对扩增*ipt*基因片段的引物为CYT:5'-GAT CGG GTC CAA TGC TGT-3 (8867~8884),CYT:5'-GAT ATC CAT CGA TCT CTT-3 (9298~9276)。细菌模板DNA制备时取菌落或菌液,加入100  $\mu$ L细菌DNA抽提液(20 mmol Tris-Cl, pH 8.0, 1 mmol EDTA, 1 mmol NaCl, 0.5% Triton X-100)。100  $^{\circ}$ C处理2 min,冰浴2 min, 10 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>离心1~2 min,取上清液作为细菌模板。病、健组培苗和遗传转化瘤组织模板DNA的抽提按标准CTAB法<sup>[10]</sup>,材料先加研磨液研磨,然后离心(12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 20 min),取沉淀加

DNA 抽提液抽提 DNA, 然后用蛋白酶 K/十六烷基三已基溴化铵(PK/CTAB) 抽提染色质 DNA。

PCR 扩增条件为 94 45 s, 52 80 s, 72 90 s, 30 循环, 72 保温 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 泡桐病、健组培苗对接种根癌农杆菌的反应(图 1)

分别用根癌农杆菌菌液伤口接种健康组培苗 T35-028 和 ZH 时, 无论是去顶接菌或是基部切口接菌皆诱导较大的淡绿色瘤状组织; 至 30 d 直径可达 0.85 cm。生长 35~40 d 后, 瘤组织生长速度减慢, 且表面变褐, 有水渍状菌浓出现。已感染植原体且表现严重丛枝症状的病组培苗 C85-028D 接种此菌时未产生明显的瘤状组织, 接种轻症苗时出现较小的瘤状组织; Q4D 病苗能在接种伤口处产生较小的瘤状组织, 至 30 d 瘤组织直径仅为 0.25 cm 左右; C85-034D 仅在接种伤口处有微突起, 未形成明显的瘤状组织。

接种根癌农杆菌后, 对丛枝病组培苗会产生症状减轻效应, 包括丛枝叶片增大、节间伸长及生根等, 而对健苗生长的促进作用不明显, 甚至出现抑制作用。

### 2.2 泡桐遗传转化瘤的生长和分化特点

根癌农杆菌接种健株 T38-028 和 ZH 20~30 d 后, 切取淡绿色瘤状组织, 切成直径约 0.2~0.4 cm 小块, 移入含羧苄青霉素的无激素 MS 固体培养基上, 20 d 左右瘤组织开始迅速生长, 继续在含羧苄青霉素的 MS 培养基上继代培养 2~4 次, 获得了无菌的 T35-028 和 ZH 的遗传转化组织,

简称 AT-T35 和 AT-ZH。此转化组织可在 MS 培养基上迅速生长, 但正常泡桐不定芽分化培养基( $MS+2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$ )不能使此转化瘤组织分化不定芽。经激素诱导( $MS+4.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$ )形成的未转化的泡桐愈伤组织切块不能

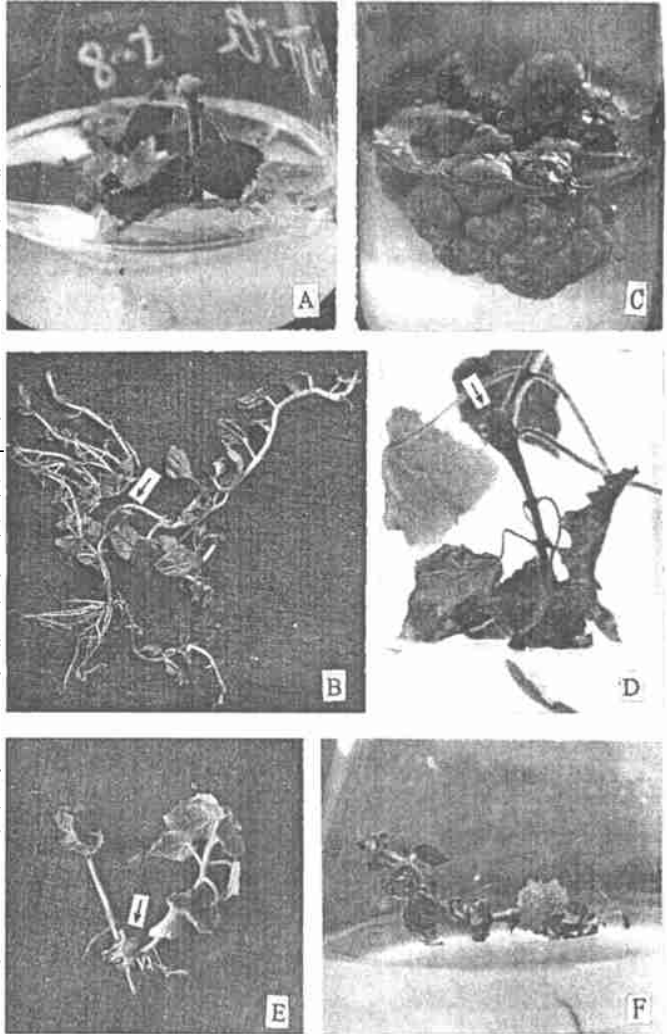


图 1 杨树根癌农杆菌 T-DNA 遗传转化泡桐结果

A. T35-028 去顶接种根癌农杆菌 诱导肿瘤; B. 感染植原体的 C85-034D 接种根癌农杆菌后, 致瘤不明显, 丛枝症状减轻(右枝), 未接菌枝, 丛枝症状严重(左枝); C. T35-028 遗传转化瘤形态, 在 MS 培养基上生长; D. AT-ZH 嫁接 ZH 主茎中部引起茎叶枯萎; E. AT-ZH 嫁接 ZH 茎基部引起根芽丛生; F. AT-ZH 嫁接 C85-028D, 初期症状减轻, 后期随瘤组织体积增大, 丛枝症状再加重。图中箭头示接菌或嫁接部位。

在无激素的 MS 培养基上维持生长,并逐渐变褐枯死。由于已知此菌在 T-DNA 上携带了合成细胞分裂素和生长素的基因,故由此肯定细菌的 T-DNA 已被整合到泡桐染色体上<sup>[4,5,8]</sup>。

在 MS 培养基上,无性系 ZH 和 T35-028 的瘤状组织生长和形态存在明显差异,前者由疏松的小球状组织构成,开始为绿色至淡绿色,在继代培养过程中逐渐失去叶绿素产生能力而变成乳白色至灰白色;后者瘤组织为较致密的整体,呈淡绿色至浅褐色。出现这种差异的原因可能与无性系特性或与 T-DNA 被整合到泡桐染色体的拷贝数有关。在最初的继代培养过程中,常出现部分切块瘤组织枯死现象;后期的继代培养过程中,死亡外植体的比例逐渐减少,推测为未转化嵌合细胞因激素供应不足而死亡。无叶绿素的瘤状组织,通过改变培养基中 6-BA 和 NAA 的浓度和比例,可使之变成绿色或浅绿色,但不能获得分化不定芽的能力。

### 2.3 用 T-DNA 转化瘤组织嫁接组培苗对症状的影响

将切块瘤组织分别插接到泡桐病、健组培苗茎中部或茎基部的切口上,瘤组织可存活或生长,但瘤组织生长速度明显低于在 MS 培养基上的生长速度。当病株茎中部嫁接的瘤组织生长到一定体积后,常导致接口坏死现象,而嫁接到茎基部时则接口坏死不明显。瘤组织嫁接初期可明显减轻丛枝症状严重度,延长病苗存活时间,表现为节间伸长、叶片增大并有毛根分化等。后期则出现两种不同情形:一是随着瘤组织的增大,丛枝症状加重,二是瘤组织增长缓慢,丛枝症状进一步减轻。健株接上瘤组织后出现从嫁接部位沿主茎向上和向下持续性茎叶枯死。在嫁接瘤组织的部位,病苗和健苗都常出现毛状气生根分化现象(图 1-E、F)。

以上现象皆从不同侧面暗示了根癌农杆菌瘤组织中的激素对泡桐病与健苗都产生了不同的影响。由于健株本身的激素代谢是相对平衡的,根癌农杆菌瘤组织中激素的无控制分泌会打破被嫁接的健株正常代谢平衡而引起“中毒”症状<sup>[11,12]</sup>。而嫁接的瘤组织恰好在一定程度上补偿了病株因植原体侵染而导致的激素水平的降低。譬如将瘤组织接于病株 ZD 主茎基部后,虽然根癌农杆菌瘤组织一直未有明显的增大,但却一直保持生活状态,而病株的丛枝症状有明显减轻,并出现根的分化。说明了瘤组织激素对被嫁接的组培苗产生了直接的效应。

### 2.4 *ipt* 基因片段 PCR 扩增结果(图 2-A、B)

用 CYT 和 CYT 引物对,可由杨树根癌农杆菌 DNA 为模板扩增出 427 bp 的 *ipt* 基因片段,与已报道的结果一致<sup>[9,13]</sup>,但未能从已去掉 T-DNA 上激素合成基因的工程菌株 AT-GUS 和 AT-TH 扩增出此特异片段<sup>[14]</sup>。同时遗传转化的泡桐瘤组织 AT-ZH 和 AT-T35 也扩增出此特异片段,这进一步从分子水平上验证了 T-DNA 已被整合到泡桐的染色体上,以及 T-DNA 中含有激素合成基因的判断。

用此引物,以泡桐和甘薯健康组培苗和感染植原体的丛枝组培苗总 DNA(包括植物和植原体 DNA)为模板 PCR 均未扩增出与 *ipt* 基因片段一致的 427 bp 的 PCR 产物,表明植物和植原体可能不含有与根癌农杆菌一致或相近的 *ipt* 基因。

用植物总 DNA 为模板进行 PCR 时,常扩增出 1 至多条分子量大于 427 bp DNA 片段;此类片段在不同泡桐无性系、泡桐病株和健株及甘薯病株和健株中都会出现,故为非特异性扩增产物。由于这些片段的分子量与 427 bp 靶序列区别明显,且含量较低,故不影响对阳性结果的判别,并可以通过调整模板 DNA 及 *Taq* DNA 酶加入量和减少电泳加样量等加以消除。

## 3 讨论

本研究从根癌农杆菌接种已感染植原体的组培苗和健康组培苗表现致瘤性的差异,和遗传转化瘤组织嫁接病、健组培苗对症状和生长影响的分析,推断根癌农杆菌 T-DNA 与细胞分

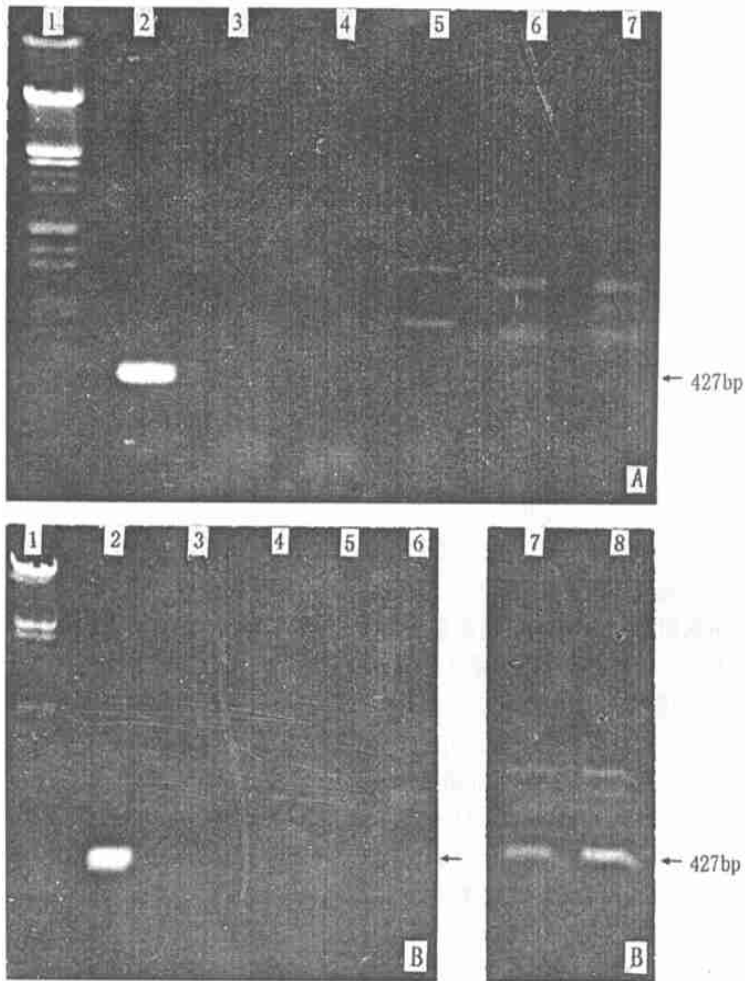


图 2 用 PCR 检测杨树根癌农杆菌异戊烯基转移酶基因

胶板 A 和 B PCR 结果:泳道 A-1 和 B-1, 分子量标准  $\lambda$ DNA/*EcoRI*/*Hind* III; A-2 和 B-2, 根癌农杆菌 427 bp 扩增产物; A-3、A-4 和 B-3, AT-GUS; A-5 和 B-4, AT-TH; A-6, 甘薯健组培苗; A-7, 甘薯丛枝病组培苗; B-5, 泡桐健康组培苗; B-6, 泡桐丛枝病组培苗; B-7, AT-T35; B-8, AT-ZH。

裂素和生长素合成相关基因已被整合到泡桐的染色体上, 并获得了稳定表达。

作者对感染植原体的泡桐体内的激素代谢变化研究结果已经发现, 病组织中的游离 IAA 含量的下降是丛枝症状产生的重要原因, 而 IAA 含量的降低又与病原定殖部位的过氧化物酶-IAA 氧化酶的升高密切相关<sup>[1]</sup>。因而, 本研究中出现感染植原体的病组培苗接种农杆菌时致瘤能力下降和嫁接遗传转化瘤后丛枝症状减轻现象, 可能不仅与健株组织的叶片大, 光合作用正常, 有利于瘤组织生长物质的供应有关, 而且更与丛枝病苗整株生长素水平低于健株有直接关系<sup>[1,16]</sup>。虽然接种的根癌农杆菌也已使病组织细胞转化, 并具备了合成生长素和细胞分裂素的能力, 但因病苗对转化细胞中合成激素的较强转移和具有的吸收库作用以及持续的 IAA 氧化作用, 导致病株难以像健株泡桐那样在伤口处积累足够致瘤所需的激素浓度或比例。而用转化瘤组织嫁接染病的丛枝组织时, 瘤组织合成和分泌的生长素和细胞分裂素能在一定程度上

逆转因植原体作用而导致的内源激素水平的降低作用, 产生了与植物生长调节剂处理泡桐组培病苗类似的效应<sup>[16]</sup>。

关于植原体自身是否具有激素合成基因问题迄今尚无定论。本研究试图用根癌农杆菌专化的 *ipt* 基因引物, 以植原体总 DNA 为模板进行 PCR 来揭示植原体的类似基因信息, 但反复的试验结果皆未能证明泡桐丛枝病植原体含有与根癌农杆菌类似的 *ipt* 基因结构。虽然近来的分子生物学研究已检测到植原体存在染色质外 DNA, 包括相似其它细菌的质粒结构<sup>[17,18]</sup>, 但对这些染色质外 DNA 的特性和功能仍一无所知。因而, 下一步将用克隆的 *ipt* 等基因片段制备相应的探针, 用于植原体的染色质 DNA 和染色质外 DNA 的进一步鉴定, 这对于深入揭示植原体的致病机制具有重要意义。

本研究首次直接证明了通过根癌农杆菌转化途径可以将外源 DNA 导入泡桐细胞, 但试验未能从此遗传转化瘤获得转化植株。根据泡桐易于组培和植株再生的特性<sup>[15]</sup>, 作者正在着手开展用剔除激素合成基因的根癌农杆菌工程菌株建立标准的泡桐遗传转化体系和抗病相关基因转移研究。建立的 PCR 检测致病根癌农杆菌技术, 为快速准确鉴定此病害提供了可靠的手段, 也可用于土壤和各种植物组织中致病根癌农杆菌的检测与鉴定, 比常规的细菌致病力测定方法节省时间和费用, 结果与细菌的接种致瘤性完全一致<sup>9,19)</sup>。

## 参考文献:

- [1] 田国忠, 黄钦才, 袁巧平, 等. 感染 MLO 泡桐组培苗代谢变化与致病机理的关系[J]. 中国科学 B 辑, 1994, 24: 484 ~ 490.
- [2] Chang C J. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on the periwinkle [J]. Phytopathol, 1997, 88: 1347 ~ 1350.
- [3] 何放亭, 武红巾, 陈子文, 等. C/A 值与甘薯丛枝病症状发生的关系[J]. 植物病理学报, 1997, 27: 43 ~ 46.
- [4] Kado C I. Phytohormone-mediated tumorigenesis by plant pathogenic bacteria [A]. In: Verma D D S, Hohn T H. In Genes Involved in Microbe-Plant Interactions [M]. Springer-Verlag Wien, 1984. 311 ~ 336.
- [5] Morris R O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens [J]. Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol, 1986, 37: 509 ~ 538.
- [6] 张静娟, 周娟, 相望年. 中国毛白杨根癌土壤农杆菌的类型和对土壤杆菌素敏感性的研究[J]. 微生物学报, 1988, 28: 12 ~ 18.
- [7] 卜学贤, 林志平, 陈维伦. 农杆菌对毛白杨的转化及完整转化植株的获得[J]. 植物学报, 1991, 33: 206 ~ 213.
- [8] 温尚昆, 董春海, 尹承肖. 由根癌农杆菌介导向毛白杨导入激素合成基因建立遗传转化系统[J]. 生物技术, 1997, 7: 11 ~ 14.
- [9] Haas J H, Moore L W, Ream W, et al. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 2879 ~ 2884.
- [10] 朱水芳. 几种果树类病毒和植原体的分子生物学研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1997.
- [11] Thomas J C, Smigocki A C, Bohner H J. Light-induced expression of *ipt* from *Agrobacterium tumefaciens* results in cytokinin accumulation and osmotic stress symptoms in transgenic tobacco [J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 225 ~ 235.
- [12] Ainley W M, McNeil K J, Hill J W, et al. Regulatable endogenous production of cytokinins up to toxic levels in transgenic plants and plant tissues [J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 13 ~ 23.
- [13] 李汝刚. 表达 Harpin<sub>Ea</sub> 和 Osmotin 基因的马铃薯植株对晚疫病的抗性分析[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 1997.
- [14] Barker R F, Idler, K B, Thompson D V, et al. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi1 5955 [J]. Plant Mol Biol, 1983, 13: 335 ~ 350.
- [15] Dong L C, Sun C W, Thies K L, et al. Use of polymerase chain reaction to detection pathogenic strains of *Agrobacterium* [J]. Phytopathol, 1998, 82: 434 ~ 439.
- [16] Tian Guo-zhong, Yuan Qiao-ping, Huang Qin-tai, et al. Effects of plant growth regulators and phenolic compounds

on paulownia culture *in vitro* infected with MLO [J]. Int J Tropical Plant Dis, 1994, 12: 43 ~ 52.

- [ 17 ] Denes A S, Sinha R C. Extrachromosomal DNA elements of plant pathogenic mycoplasma-like organisms [J]. Can J Plant Pathol, 1991, 13: 26 ~ 32.
- [ 18 ] Kuske C R, Kirkpatrick B C, Davis M J, et al. DNA hybridization between western aster yellows mycoplasma-like organism plasmid and extrachromosomal DNA from other plant pathogenic mycoplasma-like organisms [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1991, 4: 75 ~ 80.
- [ 19 ] 黄钦才, 林静芳, 董茂山, 等. 泡桐杂种叶片培养中愈伤组织的诱导和不定芽的形成 [J]. 林业科学, 1986, 22: 291 ~ 294.

## Effects of *Agrobacterium tumefaciens* on the Symptoms of *Paulownia* sp. Plantlet *in Vitro* Cultured

TIAN Guo-zhong<sup>1</sup>, ZHU Shui-fang<sup>2</sup>, LUO Fei<sup>1</sup>, LI Hui-fang<sup>3</sup>, QIU Wei-fan<sup>3</sup>

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China;

2. Plant Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Beijing 100029, China;

3. College of Plant Protection, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** By using *Agrobacterium tumefaciens* isolated from poplar crown gall disease with the hormone-producing genes in the T-DNA to inoculate healthy and infected *Paulownia* plantlets with phytoplasma, it is showed that tumorigenesis of diseased plantlets dropped apparently and the symptoms of witches' broom suppressed to some extent. The T-DNA was transformed into *Paulownia* resulting in tumor formation independent of exogenous hormone addition and keeping subculture of tumor tissues for more than 2 years, thus confirming that the tumor tissues gained the ability to synthesize cytokinin and auxin by itself. Based on the conserved sequence of isopentenyl adenosine transferase gene (*ipt*) of *Agrobacterium tumefaciens* Opine pTil 5955 strain, a pair of DNA primers (CYT and CYT) were designed and synthesized. A 427 bp polymerase chain reaction (PCR) product, the same size as the *ipt* gene fragment of pTil 5955 was amplified in association with *Agrobacterium tumefaciens* strain causing poplar stem gall disease rather than recombinant plasmid without this gene. The specific fragment of 427 bp was also amplified using the DNA extracts from transformed tumor tissues of two *Paulownia* clones (AT-ZH and AT-T35) with the *Agrobacterium tumefaciens* as templates, therefore further verifying the insert of T-DNA to the chromosome DNA of *Paulownia* and *Paulownia* can be surely transformed through *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid vector. The specific 427 bp product was not amplified by using total DNA extracts of both *in vitro* cultured healthy and infected paulownia and sweetpotato infected with phytoplasmas as templates. When the transformed tumor tissues were grafted onto the infected *in vitro* cultured *Paulownia* plantlets with phytoplasmas, the symptoms of witches' broom reduced apparently, including reduced severity, prolonged survival time and increased rooting ability of the plantlet, which, on other aspect, suggests the involvement of the hormone metabolism in paulownia-phytoplasma interaction.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*; *Paulownia* witches' broom phytoplasma; disease symptom; isopentenyl adenosine transferase gene (*ipt*); polymerase chain reaction (PCR)