

cry3A 和 *vhb* 基因在转基因马铃薯中的表达

周壮志 周永刚 何朝族 莽克强 田颖川*

(中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 分别构建了含 *cry3A* 和 *cry3A + vhb* 基因的植物表达载体 pBCry3A 和 pBC₃Vhb, 并通过根癌农杆菌介导转化了马铃薯. 对转化再生植株进行 PCR 和 DNA 印迹分析表明, 外源基因已整合到马铃薯基因组中, 且连续三代无性繁殖后转基因仍存在. ELISA 分析表明 *cry3A* 基因在转基因植株中得到了高效表达, 在单转 *cry3A* 植株中最高表达量达 0.1%, 转 *cry3A* 与 *vhb* 双基因株系中为 0.065%. 水涝试验显示, 转双基因且 *vhb* mRNA 的 RT-PCR 呈阳性的马铃薯植株, 对低氧胁迫有较好的耐受性, 表明获得的上述转双基因马铃薯株系可能会具有很好的抗虫和耐涝性能.

关键词 *cry3A* 基因, *vhb* 基因, 转基因马铃薯, 耐涝

学科分类号 Q81

马铃薯是重要的粮、菜兼用作物, 全世界每年的总产量将近 3 亿吨, 中国占了其中的 18%, 居世界第一位^[1]. 作为一种主要粮食兼蔬菜作物, 马铃薯在我国尤其在西北部地区的农业生产中占据着重要的地位. 马铃薯甲虫 (Colorado potato beetle, CPB) 属鞘翅目、叶甲科, 又名马铃薯叶甲, 是一种分布最广、危害最大的马铃薯害虫, 其成虫、幼虫不仅暴食马铃薯叶片造成薯产量锐减, 并且对化学农药易产生抗药性, 在北美、欧洲等地已成为严重制约马铃薯生产的一种灾害. 为防止这一灾害性昆虫的入侵, 我国已对这种昆虫进行重点检疫. 但是由于马铃薯甲虫扩散速度快, 一旦侵入, 将会对我国马铃薯及相关蔬菜作物生产造成严重威胁, 因此积极防御意义重大.

利用植物基因工程的方法选育优良的抗虫植物品种已被证实为一种控制虫害的有效途径^[2]. 其中, 苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 杀虫蛋白基因在抗虫基因工程中发挥了极其重要的作用, Perlak 等^[3]根据植物基因的特点, 在保持氨基酸序列不变的情况下, 对 *Bt* 杀虫蛋白基因 *cryIac* 进行了完全改造, 大大提高了 *cryIac* 基因的表达水平, 并用此改造后的基因首次获得了有实用价值的抗虫转基因棉花^[4]. 此后, Sutton 等^[5]对特异毒杀鞘翅目昆虫的 *cry3A* 基因 (本文根据 *Bt* 杀虫晶体蛋白命名委员会公布并经修订的命名系统^[6]对该基因名称作了修正) 进行了重新合成. 试验显示, 表达该基因的烟草蛋白质提取物对马铃薯甲虫有明显的抑制作用, 表明改造后的 *cry3A* 基因在抗甲虫转基因植物研究上具有应用价值. Perlak^[7]及 Adang 等^[8]后来用各

自合成的 *cry3A* 基因, 均获得了可有效抵抗马铃薯甲虫的转基因马铃薯植株. 1995 年, 孟山都公司转 *cry3A* 基因的抗甲虫马铃薯新品种 (Newleaf) 获准商业化生产.

透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla Hemoglobin*, VHb) 是一种原核生物类血红蛋白, 因血红蛋白具有结合、运输氧的功能, 暗示其在与氧代谢有关的生理过程中会发挥作用. Holmberg 等^[9]将 *vhb* 基因转化到烟草中, 发现转基因烟草在生长 35 天后的干物重比野生型提高了 80% ~ 100%, 而且叶绿素含量和次生代谢物尼古丁也有明显的增加 (分别为 30% ~ 40% 和 34%). Leif 等^[10]的工作亦表明, *vhb* 基因的表达能提高转基因植株的呼吸代谢和生物合成. Mao 等^[11]的试验还显示, 转 *vhb* 基因的矮牵牛能够表现出较强的耐涝能力.

我们试图用 *cry3A*、*vhb* 基因转化马铃薯, 选育抗甲虫、产量高、抗逆性强的马铃薯新种质, 希望为发展我国马铃薯产业, 防患于未然, 为在我国边疆地区建立一个可防止马铃薯甲虫入侵的全方位的绿色防护带, 提供有实用价值的马铃薯新材料. 本文报道此项研究的初步结果.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 含有透明颤菌血红蛋白 *vhb* 基因编码序列的质粒 pBRVgb, 由中国科学院上海

* 通讯联系人.

Tel: 010-62642577, E-mail: tianyc@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2004-03-11, 接受日期: 2004-04-07

生物工程研究中心杨胜利院士馈赠。含合成的苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白 *cry3A* 基因^[6]的质粒 pSPCry3A, 由美国新墨西哥州立大学 Kemp 教授提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 为本实验室保存。

1.1.2 植物: 供试马铃薯品种为新疆、内蒙古等地主栽品种“紫花白”, 由中国科学院微生物研究所彭学贤研究员提供无菌试管幼苗。

1.1.3 工具酶与试剂: 各种限制性内切酶、T4 连接酶等购自 Takara 和 NEB 等公司; Taq DNA 聚合酶购自上海生工公司; 同位素 α -³²P-dCTP 为福瑞公司产品; Cry3A ELISA kit 为 Agdia Incorporated 产品; RT-PCR kit 购自 Invitrogen 公司。

1.1.4 PCR 引物: 检测 *cry3A* 基因引物 P1 为 5' ACTGCTGATAACAACACGGAG 3'; P2 为 5' CAG-TGATCAGTGTACTCTTGCG 3', 用这对引物应扩增出 600 bp 左右的片段。检测 *vhb* 基因引物 VHb1 为 5' GTCGGATCCACCATGTTGGACCAGCAAACCATTAAC 3', 引入 *Bam*H I 位点; VHb2 为 5' GCT-GTCGACTCATTCAACCGCTTGAGCGTAC 3', 引入 *Sal* I 位点, 用它们应扩增出 480 bp 大小的片段。以上引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体 pBC₃Vhb 的构建及其向农杆菌的转移: 为便于构建植物表达载体, 以 pBRVgb 为模板用引物 VHb1 和 VHb2 进行 PCR 扩增, 得到 480 bp 的 *vhb* 基因片段, 将该片段克隆到 pUC19 的 *Sma* I 位点上, 即得到两端含有 *Sal* I 和 *Bam*H I 位点的 *vhb* 基因重组质粒 pUVhb。用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切质粒 pUVhb 后回收 *vhb* 结构基因片段, 与 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切的 pD12 载体^[12]片段连接, 即得重组质粒 pDVhb。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后, 利用菌落 PCR 或酶切方法鉴定重组质粒 pDVhb。该重组质粒含有由双增强子的 CaMV35S 启动子-TMV Ω 片段、*vhb* 基因和 *Nos* 转录终止序列组成的表达框架。

为构建 *cry3A* 植物表达载体, 对 pSPCry3A 两端的酶切位点通过适当酶切和加 linker 等 DNA 重组技术进行了适当调整, 使该基因 5' 端和 3' 端分别含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 位点, 调整后的重组质粒定名为 pLFz-1。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切 pLFz-1, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离回收 1.8 kb 的 *cry3A* 基因片段, 然后与同样酶切的二元表达载体

pBin438^[13]的载体片段连接, 即得 *cry3A* 基因的植物表达载体 pBCry3A。用 *Hind* III 酶切 pDVhb, 回收约 1.5 kb 大小的 *vhb* 基因表达框, 与 *Hind* III 酶解的 pBCry3A 连接, 即得 *cry3A* 和 *vhb* 基因的表达载体 pBC₃Vhb。上述连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 用菌落 PCR 或酶切方法证明构建正确后即可用于农杆菌的转化。农杆菌的转化方法参见文献 [12]。以上所有 DNA 重组技术参照文献 [14]。

1.2.2 马铃薯外植体的转化和再生: 用无菌培养的马铃薯叶片作外植体, 外植体与农杆菌的共培养、芽和根的诱导及抗卡那霉素植株再生等, 均参照文献 [15] 进行, 同时作了部分修改, 愈伤诱导激素改用 0.25 mg/L 的萘乙酸 (NAA)、2.25 mg/L 的细胞分裂素 6-BA 和 10 mg/L 的赤霉素 GA-3, 到芽分化时从 MS 培养基中去掉 NAA, 根分化也在 MS 培养基上进行。

1.2.3 转化再生植株的 PCR 分析: 马铃薯叶片总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[15]。用 1.1.4 述及引物按常规方法^[14]进行 PCR 扩增, 取反应混合物在含溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.2.4 马铃薯叶片总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测: 按文献 [14] 及 RT-PCR 试剂盒提供的方法进行。

1.2.5 转基因马铃薯的 DNA 印迹分析: 约 20 μ g 马铃薯总 DNA 用 *Hind* III 彻底酶解后, 在 1.0% 琼脂糖胶上电泳, 将胶上的 DNA 转移至 Hybond-N⁺ 膜上。探针为 P1、P2 引物扩增的 *cry3A* 基因片段, 经纯化后按 Amersham Pharmacia Biotech 公司 (RediprimeTM II) 提供的方法用 α -³²P-dCTP 予以标记。按文献 [14] 提供方法进行杂交。

1.2.6 Cry3A 的 ELISA 检测: 按试剂盒提供的试剂、方法进行, 在 BioRad Microplate Reader (Model 550) 上读取 A₄₅₀ 值, 从 Cry3A 蛋白标准曲线查得样品中 Cry3A 的量。

可溶性蛋白测定: 取 0.1 g 马铃薯幼嫩叶片, 用 1 ml PBS 研磨, 离心后取上清液, 按一定比例稀释于 1 $\times$ BioRad 公司的蛋白质染液中, 在 595 nm 光波下测其吸收值, 根据读数和蛋白质标准曲线折算出可溶性蛋白含量。

1.2.7 转基因马铃薯的水涝模拟试验: 当马铃薯长到现蕾期时, 将转 *cry3A*、*vhb* 基因的植株和非转基因植株、单转 *cry3A* 基因的植株置于一个大水池中, 往池中注水至马铃薯植株的根部全部淹没。每

两天观察植株的变化,直至第7天。

2 结果与讨论

2.1 植物表达载体的构建及马铃薯的转化

按材料与方法所述,构建了 *cry3A* 基因植物表达载体 pBCry3A 和含 *cry3A* 与 *vhb* 基因的植物表达载体 pBC₃Vhb,在这两个载体中,外源基因的表达均由含双增强子的 CaMV 35S 启动子-TMV Ω 片段和 Nos 转录终止序列所控制。pBC₃Vhb 中 T-DNA 的结构见图 1。将 pBCry3A 和 pBC₃Vhb 分别转入根癌农杆菌 LBA4404 后即可用于马铃薯的转化。

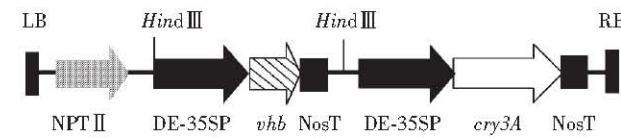


Fig. 1 Schematic diagram of the T-DNA structure of the plant expression vector pBC₃Vhb

NPTII, DE-35SP and NosT represent neomycin phosphotransferase gene expression cassette, CaMV 35 S promoter with double enhancer sequence, Ω fragment of TMV - RNA cDNA and transcriptional termination sequence of nopaline synthase gene, respectively. LB and RB represent the T-DNA left and right border sequences.

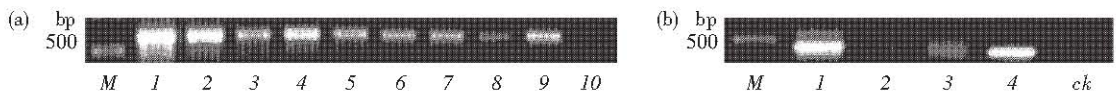


Fig. 2 PCR detection of transgenic potato plants

(a) Amplified with primers P1 and P2. M: DNA marker DL2000 (Takara); 1: Positive control, pBC₃Vhb; 2~6: *cry3A*-transformed potato plants; 7~9: *cry3A* + *vhb*-transformed potato plants; 10: Non-transformed potato. (b) Amplified with primers Vhb1 and Vhb2. M: DNA marker DL2000 (Takara); 1: Positive control as in (a); 2~4: C₃V₁, C₃V₅, C₃V₇, respectively; ck: Non-transformed potato.

2.3 转 *cry3A* 基因马铃薯株系的 DNA 印迹分析

为确定上述 PCR 阳性植株的转基因性质,用 P1、P2 引物特异扩增的 *cry3A* 基因片段为探针,对 *Hind* III 酶解的部分马铃薯 DNA 进行了杂交分析(图 3)。结果表明, *cry3A* 基因至少已整合到被检植株的染色体中,而且根据杂交条带数目推断, *cry3A* 基因的插入拷贝应在 1 至 3 个不等,其中, C₃-10、C₃-242 株系是单拷贝(图 3-6, 7)。

2.4 Cry3A 蛋白在转基因马铃薯叶片中的表达

用 ELISA Kit 对转基因马铃薯株系进行了

经根癌农杆菌转化马铃薯叶外植体,分别获得了 16 个转 *cry3A* 基因和 8 个转 *cry3A* + *vhb* 基因的再生马铃薯株系。在温室条件下,转基因马铃薯在植株形态和生长发育进程与非转基因植株无明显差异,未观察到 Holmberg 等^[9]报道的转 *vhb* 基因烟草生长量增加、叶绿体增加等现象,但这些转基因株系在田间条件下的表现及对产量的影响有待深入的研究。

2.2 转基因马铃薯的 PCR 检测

取马铃薯的幼嫩叶片提取总 DNA 后进行 PCR 检测。8 个转 *cry3A* 基因的马铃薯株系(C₃-1、C₃-10、C₃-11、C₃-14、C₃-25、C₃-101、C₃-242、C₃-251)和 3 个转 *cry3A* + *vhb* 基因的马铃薯株系(C₃V₁、C₃V₅、C₃V₇)均可扩增出约 600 bp 大小的 *cry3A* 基因片段(图 2a 为部分样品的结果)。用 *vhb* 基因的一对引物扩增 3 个转双价基因植株,结果只有 C₃V₇ 扩增出与正对照一致的 480 bp 大小片段,而 C₃V₁、C₃V₅ 仅表现出微弱的带(图 2b)。这初步表明, *cry3A* 和 *vhb* 基因至少已整合到 C₃V₇ 株系的基因组中。共选出移植成活并能正常生长、结薯且 PCR 呈阳性的转 *cry3A* 基因植株共 8 株,转双基因的 1 株。用这些植株产生的薯块繁殖至第三代(2000~2003 年)后,PCR 检测结果仍保持一致(数据略),表明外源基因在马铃薯无性繁殖传代时未发生丢失。

Cry3A 蛋白的定量检测,并通过测定各株系的总可溶性蛋白含量,可算出各株系 Cry3A 蛋白的表达水平(图 4)。不同转基因马铃薯株系中 Cry3A 蛋白表达水平并不一致。最高表达量(C₃-10)为 32 μg 每克鲜叶重,占总可溶性蛋白的 0.107%,与 Perlak 等^[7]报道的大部分植株的表达量相当;最低的(C₃-251)为 1.6 μg 每克鲜叶重,占总可溶性蛋白的 0.004%。Perlak 发现,完全抗马铃薯甲虫幼虫转基因植株的 Cry3A 蛋白表达水平至少应为 0.002%,我们获得的转基因马铃薯株系的 Cry3A

蛋白表达水平均在 0.002% 以上, 因此从理论上是可以有效抗马铃薯甲虫的。

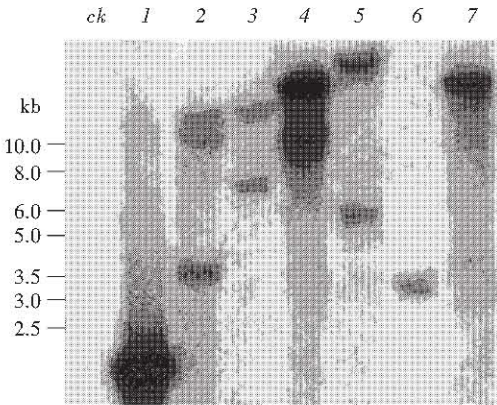


Fig. 3 Southern blot analysis of *cry3A* gene in some transgenic potato plants
ck: Non-transformed potato DNA; 1: pBC₃Vhb digested with *Hind*III and *Eco*RI; 2~7: transgenic potato line C₃-1, C₃V₇, C₃-14, C₃-251, C₃-10, C₃-242, respectively. All plant DNAs were digested with *Hind*III only.

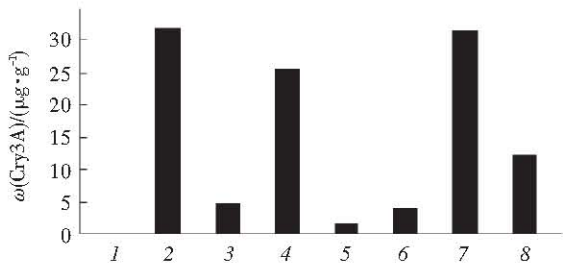


Fig. 4 Expression level of Cry3A in transgenic potato lines
1: Non-transformed potato line; 2~8: transgenic potato line C₃-10, C₃-14, C₃-242, C₃-251, C₃V₁, C₃V₅, C₃V₇, respectively.

2.5 转 *vhb* 基因的表达及对低氧环境的耐受性

对 3 个双基因转化株 (C₃V₁、C₃V₅、C₃V₇) 进行的 RT-PCR 分析结果发现, 只有 C₃V₇ 株系可扩增出 480 bp 左右的片段(图 5), 表明 C₃V₇ 株系

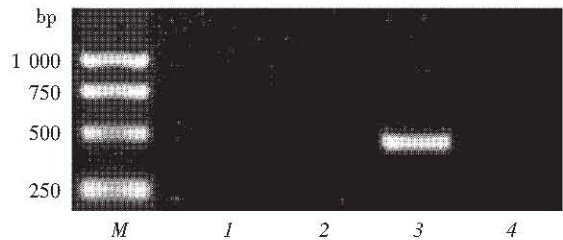


Fig. 5 RT-PCR analysis for *vhb* mRNA in transgenic potato plants transformed with pBC₃Vhb
M: DNA marker DL2000 (Takara); 1~4: C₃V₁, C₃V₅, C₃V₇, Non-transformed potato line, respectively.

中 *vhb* 基因已得到表达. 而另两个株系未能扩增出条带, 这两个株系在 PCR 检测中也未能形成明显的扩增带(图 2b), 因此 *vhb* 基因在这两个株系中可能已丢失. 这种现象在转双价基因植株中并非罕见^[16].

为研究转 *vhb* 基因的马铃薯植株对低氧环境的耐受性, 做了水涝模拟试验. 将长势基本一致的 C₃V₇ 株系、转 *cry3A* 基因植株及非转基因植株的根系浸没于水中, 观察各株系的变化. 从图 6 可看出, C₃V₇ 株系表现出很好的抗涝性(图 6-4, 5, 6), 7 天的水淹结果仅使其表现出轻微的萎蔫状, 基部仅有一个或无叶片变黄, 而转 *cry3A* 基因植株(图 6-2, 3)和非转化株(图 6-1)严重萎蔫, 这些植株基部都有 3~4 个叶片变黄、脱落. 这一现象与 Mao 等^[11]用转 *vhb* 基因的矮牵牛所得的结果基本一致. 该现象应与 *vhb* 基因的表达产物 VHb 有关, 因为 Holmberg^[9]的试验指出, VHb 表达后, 提高了氧的供应, 呼吸加速, 降低有毒的发酵产物, 从而使转基因烟草种子得以提前萌芽. Leif 等^[10]的工作亦证实, *vhb* 基因的表达能提高转基因植株的呼吸代谢. 尽管抗涝的机制有待于深入的研究, 该结果已初步表明, 转 *vhb* 基因的马铃薯植株对低氧环境有较好的耐受性, 可克服马铃薯不耐涝的缺点, 使其在易涝的条件下也可种植, 因而有利于利用这一抗虫转基因作物, 建立一个地域广泛的能有效抵御马铃薯甲虫入侵的绿色防护带。

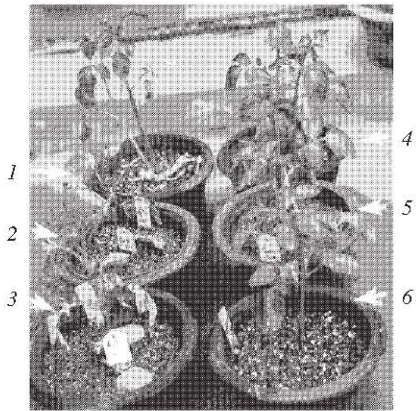


Fig. 6 Waterlogging-tolerance test of transgenic potato plants
1: Non-transformed potato line; 2, 3: *cry3A* transgenic line C₃-14, C₃-11, respectively; 4~6, *cry3A* + *vhb* transgenic line C₃V₇. The picture was taken after 7 days' waterlogging.

参 考 文 献

- 1 屈冬玉, 金黎平, 谢开立, 等. 中国马铃薯产业现状、问题和趋势. 见: 陈伊里主编. 马铃薯产业化与西部开发. 黑龙江: 哈尔滨工程大学出版社, 2001. 1~8
Qu D Y, Jin L P, Xie K L, *et al.* Present state, problems and trends of potato industry in China. In: Chen Y L ed. Potato Industry and Development of the West China. Heilongjiang: Haerbin Engineering University Press, 2001. 1~8
- 2 周兆嫻, 朱 祯. 植物抗虫基因工程研究进展. 生物工程进展, 1994, **14** (4): 18~24
Zhou Z L, Zhu Z. Prog Biotech, 1994, **14** (4): 18~24
- 3 Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, *et al.* Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, **88** (8): 3324~3328
- 4 Perlak F J, Deaton R W, Armstrong T A, *et al.* Insect resistant cotton plants. Bio/Technology, 1990, **8** (10): 939~943
- 5 Sutton D W, Havstad P, Kemp J D. Synthetic *cry* III (A) gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. Transgenic Research, 1992, **1** (3): 228~236
- 6 Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, *et al.* Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, **62** (3): 807~813
- 7 Perlak F J, Stone T B, Muskopf Y M, *et al.* Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Molecular Biology, 1993, **22** (2): 313~321
- 8 Adang M J, Brody M S, Cardineau G, *et al.* The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cry* III (A) gene in protoplasts and potato plants. Plant Molecular Biology, 1993, **21** (6): 1131~1145
- 9 Holmberg N, Lilius G, Bailey J E, *et al.* Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. Nature Biotechnology, 1997, **15** (3): 244~247
- 10 Leif B, Holmberg N, Lilius G, *et al.* The metabolic effects of native and transgenic hemoglobin on plant. Trends Biotech, 1999, **17** (1): 21~24
- 11 Mao Z C, Hu Y L, Zhong J, *et al.* Improvement of the hydroponic growth and waterlogging tolerance of *Petunias* by the introduction of *vhb* gene. Acta Botan Sin, 2003, **45** (2): 205~210
- 12 Tian Y C, Zheng J B, Yu H M, *et al.* Studies of transgenic hybrid poplar 741 carrying two insect-resistant genes. Acta Botan Sin, 2000, **42** (3): 263~268
- 13 Li T Y, Tian Y C, Qin X F, *et al.* Transgenic tobacco plants with efficient insect resistance. Science in China, 1994, **37** (12): 1479~1487
- 14 Sambrook J, Fritish E F, Manicitis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474~490
- 15 崔晓江, 彭学贤, 周雪荣, 等. 三价转病毒外壳蛋白基因马铃薯的获得. 科学通报, 1994, **39** (21): 1992~1995
Cui X J, Peng X X, Zhou X R, *et al.* Chin Sci Bull, 1994, **39** (21): 1992~1995
- 16 谢龙旭, 徐培林, 聂燕芳, 等. 抗草甘膦抗虫植物表达载体的构建及其转基因烟草的分析. 生物工程学报, 2003, **19** (5): 545~550
Xie L X, Xu P L, Nie Y F, *et al.* Chin J Biotechnology, 2003, **19** (5): 545~550

Expression of *cry3A* and *vhb* Genes in Transgenic Potato Plants

ZHOU Zhuang-Zhi, ZHOU Yong-Gang, HE Chao-Zu, MANG Ke-Qiang, TIAN Ying-Chuan*

(State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Plant expression vectors, pBCry3A and pBC₃Vhb, containing *cry3A* gene and both *cry3A* and *vhb* genes respectively, were constructed. Potato leaf-explants were transformed via *Agrobacterium* harboring pBCry3A or pBC₃Vhb respectively. Results from PCR and genomic DNA Southern blotting analysis indicate that *cry3A* or *cry3A* + *vhb* gene have been integrated into the genome of the transformed potato lines with 1~3 copies at least for *cry3A* gene. The transgenes were stable and expressed even after three successive clonic propagations. Results from ELISA analysis showed that the highest expression level of Cry3A protein reached 0.1% of total leaf soluble protein among *cry3A* transgenic plants, while that of the *cry3A* + *vhb* transgenic plant reached 0.065%. RT-PCR analysis of *vhb* mRNA and waterlogging test demonstrated that the transgenic potato plants transformed with *cry3A* + *vhb* genes expressed *vhb* gene at least at transcription level and showed obvious higher tolerance against low-oxygen stress. These results together with that of the ELISA for Cry3A indicate that this kind of transgenic plants could be valuable in application for insect resistance and waterlogging tolerance.

Key words *cry3A* gene, *vhb* gene, transgenic potato plants, waterlogging tolerance

* Corresponding author. Tel: 86-10-62642577, E-mail: tianye@sun.im.ac.cn