

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00931

# 孟德尔豌豆基因克隆的研究进展及其在遗传学教学中的应用

何风华, 朱碧岩, 高峰, 李韶山, 李娘辉

华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

**摘要:** 150 多年前, 孟德尔进行了豌豆 7 对相对性状的杂交试验, 发现了遗传学的两个基本规律。1900 年, 孟德尔定律被重新发现以后, 人们从生理生化、细胞和分子水平等不同层次上对豌豆的这 7 个性状进行了深入研究。近年, 随着分子生物学技术的发展, 已有种子形状(*R*)、茎的长度(*Le*)、子叶颜色(*I*)和花的颜色(*A*)等 4 个性状的基因被克隆; 未成熟豆荚的颜色(*Gp*)、花的着生位置(*Fa*)和豆荚形状(*V*)的基因已被定位在各自的连锁群上。4 个孟德尔基因的鉴定和克隆加深了人们对基因概念的理解: 如基因功能的多样性、在分子水平上基因变异原因的多样性、显性和隐性的分子实质等。在遗传学教学中, 把孟德尔基因克隆和研究的最新进展介绍给学生, 在分子水平上诠释经典遗传规律, 有助于提高学生的学习兴趣, 帮助学生全面把握从形式遗传学到分子遗传学的内容和遗传学的发展方向。

**关键词:** 豌豆; 基因克隆; 遗传学教学

## Research progress on the cloning of Mendel's gene in pea (*Pisum sativum* L.) and its application in genetics teaching

HE Feng-Hua, ZHU Bi-Yan, GAO Feng, LI Shao-Shan, LI Niang-Hui

School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

**Abstract:** One hundred and fifty years ago, Gregor Mendel investigated the segregation of seven traits in pea (*Pisum sativum*) and established the law of segregation and the law of independent assortment in genetics. After the two laws of genetics were rediscovered in 1900, the seven traits have been extensively investigated in the fields of plant physiology and biochemistry as well as in the cell and molecular levels. Recently, with the development of molecular technology in genetics, four genes for seed shape (*R*), stem length (*Le*), cotyledon colour (*I*), and flower colour (*A*) have been cloned and sequenced; and another three genes for immature pod colour (*Gp*), fasciation (*Fa*) and pod form (*V*) have been located in the linkage groups, respectively. The identification and cloning of the four Mendel's genes will help deeply understand the basic concept of gene in many respects: like the diversity of gene function, the different origins for gene mutation in molecular level,

收稿日期: 2012-11-12; 修回日期: 2012-12-29

基金项目: 华南师范大学教学改革项目(编号: 2009jg19)和广东省高等教育学会实验室研究会基金项目(编号: GDJ2012081)资助

作者简介: 何风华, 博士, 副教授, 研究方向: 植物分子遗传学的教学与科研工作。E-mail: hefth@scnu.edu.cn

通讯作者: 李娘辉, 副教授, 研究方向: 植物生理和分子生物学的教学与科研工作。E-mail: linh@scnu.edu.cn

网络出版时间: 2013-4-24 16:38:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130424.1638.004.html>

and the molecular nature of a dominant gene or a recessive gene. In teaching of genetics, the introduction of most recent research advancements of cloning of Mendel’s genes to the students and the interpretation of the Mendel’s laws in molecular level will help students promote their learning interests in genetics and help students grasp the whole content from classical genetics to molecular genetics and the developmental direction of this subject.

**Keywords:** pea (*Pisum sativum* L.); molecular cloning of the gene; genetics teaching

150 多年前, 孟德尔进行了豌豆 7 对相对性状的杂交试验, 发现了遗传学的两个基本规律<sup>[1]</sup>。由于孟德尔提出的遗传因子和颗粒式遗传思想的超前性, 在他宣读论文后的 34 年中, 没有受到应有的重视。1900 年, 孟德尔定律被 3 位植物学家重新发现, 遗传学作为一门新的学科建立起来<sup>[2]</sup>。1909 年, 丹麦植物学家约翰生提出了基因一词代替孟德尔的遗传因子, 但在遗传学创立的初期, 基因只是逻辑推理的产物。摩尔根发现连锁遗传规律以后, 遗传学进入了细胞遗传学阶段, 人们逐渐绘制了果蝇、玉米等真核生物的遗传连锁图。Avery 证明 DNA 是主要的遗传物质和 DNA 双螺旋结构模型提出之后, 遗传学进入了分子遗传学阶段<sup>[3,4]</sup>。分子遗传学的发展极大地扩充了遗传学的研究内容, 加深了人们对遗传现象分子实质的了解。基因组测序技术的进步促进了功能基因组学的发展。现在, 遗传学是生命科学中进展最为迅速的学科之一<sup>[5]</sup>。

遗传学是以基因为主线研究生物遗传变异规律的科学。遗传学中的一个关键问题是: “基因是什么?”。孟德尔定律被重新发现以后, 控制孟德尔性状的基因即引起了人们极大的兴趣。孟德尔研究的基因究竟是怎样控制性状形成的? 尽管研究者不能

直接获得孟德尔所应用的试验材料, 但是孟德尔应用的突变体, 有些在农业上有重要应用, 如皱粒豌豆有甜味、矮茎豌豆抗倒伏, 因而这些品种被大面积栽培和传播, 并被收藏在欧洲的研究机构(the John Innes *Pisum* germplasm collection)<sup>[6-9]</sup>。以这些品种为基础, 人们从形态解剖、生理生化、细胞和分子水平上对孟德尔研究的豌豆性状进行了多层次的研究。如今, 随着分子生物学技术的突飞猛进, 豌豆种子的形状(*R*)、茎的长度(*Le*)、子叶颜色(*I*)和花的颜色(*A*)等 4 个性状的基因已经被克隆和测序, 其基因功能在分子水平上得到了较为详细的阐明; 有关未成熟豆荚的颜色(*Gp*)、花的着生位置(*Fa*)和豆荚形状(*V*)3 个基因的研究也取得了较大的进展(表 1)<sup>[6,9]</sup>。

尽管孟德尔所研究的只是 7 个重要农艺性状的简单集合, 并不是关于某个具体生物学现象或过程的集中具体描述, 但是从生物学史的角度将这些性状进行综述仍然具有重要意义。孟德尔豌豆基因的克隆是一百多年来遗传学发展过程的一个缩影, 其中包含着非常丰富的遗传学基础理论、生物科学史和人文教育的内容。本文对孟德尔基因克隆和研究的进展进行了综述, 并讨论了其在遗传学教学中的应用。

表 1 孟德尔研究的豌豆 7 个性状及其基因的研究进展

性状	表现型		基因符号	连锁群	被克隆的年份	基因的功能	突变的分子原因	参考文献
	显性表型	隐性表型						
种子形状	圆粒	皱缩	<i>R-r</i>		1989	淀粉分支酶 (SBE )	0.8 kb 转座子样序列的插入	[7]
茎的长度	高茎	矮茎	<i>Le-le</i>		1997	赤霉素 3-氧化酶(GA3ox)	G→A 替换引起的错义突变	[21]
子叶颜色	黄色	绿色	<i>I-i</i>		2007	常绿蛋白基因(SGR)	6 bp 序列的插入突变	[25]
花的颜色	红色	白色	<i>A-a</i>		2010	bHLH 转录因子	剪切位点上 G→A 替换引起的错误剪切	[8]
未成熟豆荚的颜色	绿色	黄色	<i>Gp-gp</i>		—	与中果皮细胞叶绿体的结构有关	—	[32,33]
花的着生位置	腋生	顶生	<i>Fa-fa</i>		—	与顶端分生组织的形成和结构有关	—	[36]
豆荚形状	饱满	缢缩	<i>V-v</i>		—	与豆荚厚壁组织的形成有关	—	[9]

## 1 孟德尔豌豆基因克隆的研究进展

### 1.1 种子形状

孟德尔研究的野生型豌豆(*RR*)成熟的种子是圆形饱满的, 突变型(*rr*)豌豆尽管未成熟种子的形状与野生型相同, 但 *rr* 豌豆种子成熟后是皱缩的。早在 1903 年, Gregory<sup>[10]</sup>就发现 *RR* 豌豆子叶贮藏细胞中淀粉粒大、数目多且形状单一, 而 *rr* 豌豆的淀粉粒小、且形状复杂。之后, 学者们又发现尽管 *RR* 和 *rr* 种子的化学组成在淀粉、脂类、贮藏蛋白等许多方面都存在差异, 但最主要的表现是在淀粉含量和性质上存在差异: 圆粒豌豆淀粉含量高, 支链淀粉与直链淀粉的比例高于皱粒豌豆, 而皱粒豌豆可溶性糖的含量高于圆粒豌豆, 皱粒豌豆食用起来更甜一些<sup>[11, 12]</sup>。

皱粒豌豆(*rr*)化学组成的变化主要是因为其淀粉合成代谢受到了阻碍, *rr* 种子淀粉合成量减少, 且直链淀粉转变成支链淀粉的过程受阻, 细胞中游离葡萄糖和蔗糖含量升高, 渗透压增高; 在胚胎发育的早期, *rr* 细胞吸水量增多, 因而在种子发育早期, 细胞体积增大、种子吸水膨胀; 种子成熟后干燥失水而收缩, 于是产生皱缩的表型<sup>[13~15]</sup>。

Smith<sup>[15]</sup>发现 *rr* 豌豆淀粉分支酶 (SBE) 的活性很低, SBE 是使直链淀粉转变为支链淀粉的关键酶。1989 年, Bhattacharyya 等<sup>[2]</sup>首次克隆了编码 SBE 的基因, 并以确凿的证据证明它位于孟德尔研究的 *r* 基因座上, 进而阐明了皱皮性状形成的分子机制。他们发现野生型 SBE 编码的 *R* 基因大约为 3.3 kb, 而突变型 *rr* 中约为 4.1 kb, 在 *rr* 胚内 SBE

的基因内有一段约 0.8 kb 的插入序列, 命名为 *Ips-r*(Insertion pisum sativum-*r*)。这段序列类似于玉米的 *Ac/Ds* 转座子, 在其两个末端各有一个 12 bp 的倒转重复序列。*Ips-r* 的插入位置在 SBE 基因内的两个 8 bp 的直接重复顺序之间。由于 *Ips-r* 的插入, *rr* 胚中其 mRNA 的序列比野生型的长, 干扰了 SBE 编码基因的正常表达; *rr* 胚中, mRNA 的含量只有 *RR* 的 1/10, 使该基因的表达量显著降低。另外, 生物信息学分析表明, *Ips-r* 的插入使得从插入位点开始出现移码突变, 提前出现了一个终止密码子, 而使 *rr* 突变型的 SBE 蛋白缺失了最后的 61 个氨基酸, 形成无正常功能的 SBE 蛋白, 使直链淀粉转

变为支链淀粉的过程受阻, 最终使 *rr* 表现出皱粒性状<sup>[2]</sup>。

### 1.2 茎的长度

孟德尔豌豆杂交试验中的高茎和矮茎豌豆差异非常明显。野生型豌豆为高茎(*LeLe*), *Le* 基因主要控制豌豆节间的延长, 而不是节间的数目; 其隐性突变纯合体(*lele*)植株矮小<sup>[16]</sup>。早在 20 世纪 50 年代, 对突变体施用赤霉素后, 植株茎能长高, 人们开始把 *Le* 基因产物的功能与赤霉素的合成联系起来<sup>[17]</sup>。到了 80 年代, 越来越多的证据表明 *Le* 基因控制有生物活性的赤霉素 GA1 的产生。野生型豌豆茎中 GA1 的含量是突变型的 10 倍, 但 GA20 的含量比突变体中低得多, 野生型豌豆中把 GA20 转变为 GA1 的过程比突变体中活跃的多<sup>[18]</sup>。进一步研究表明, *Le* 基因编码赤霉素 3 $\beta$ -羟化酶(后来被重新命名为赤霉素 3-氧化酶 GA3ox), 该酶能催化赤霉素无活性的前体 GA<sub>20</sub> 转变成有生物活性的 GA<sub>1</sub>。在野生型豌豆中, GA3ox 的活性较高; 而在突变型豌豆中, GA3ox 的活性较低<sup>[19, 20]</sup>。

*Le* 基因是第二个被分离的孟德尔豌豆基因。Lester 等<sup>[21]</sup>利用拟南芥赤霉素 3-氧化酶基因(*AtGA4*)的序列作为探针筛选豌豆的 cDNA 文库, 得到了豌豆 GA3ox 基因的序列, 连锁分析表明 GA3ox 基因和 *Le* 完全共分离。测序分析发现 *Le* 基因中一个单核苷酸多态性(SNP)突变(G 转换为 A), 使其蛋白质的第 229 位的丙氨酸被替换为苏氨酸, 这个点突变发生在酶的活性中心, 降低了酶的活性。在大肠杆菌重组表达实验中 *Le* 的功能得到了证实, 突变基因 *le* 表达产物的活性只有野生型的 5%, 表明 *lele* 是一个渗漏突变体(Leaky mutation)。

Martin 等<sup>[22]</sup>发现 *Le* 基因的另外两个突变等位基因, 进一步证明了 *Le* 基因的功能。*le-2* 有两个位点发生突变, 第一个位点是其氨基酸序列第 229 位的丙氨酸被苏氨酸替换, 第二个位点是在其第 376 位缺失了 1 bp 而发生移码突变, 使翻译提前终止, *le-2* 突变来自于 *le-1*, *le-2* 是一个无功能的等位基因(Null allele)。*le-3* 突变体的产生是由于存在一个 C-T 转换, 导致 276 位的组氨酸替换为酪氨酸。利用大肠杆菌重组实验分析野生型和突变基因的产物的相对活性是: *Le*>*le-1*≈*le-3*>*le-2*<sup>[21, 23]</sup>。

### 1.3 子叶颜色

野生型豌豆在种子成熟的过程中子叶由绿色变为黄色,这一性状由 *I* 基因决定<sup>[16]</sup>。其突变体(*ii*)种子成熟后子叶仍然保持绿色,*ii* 叶片衰老后也能维持绿色,因此这种突变体通常被称为“常绿”突变体。在水稻、玉米、拟南芥等植物中都存在类似的“常绿”突变体<sup>[24]</sup>。植物的子叶或叶片衰老后变黄是一种常见的自然现象,其原因是由于叶绿素的降解。“常绿”突变体叶片叶绿素的含量虽然很高,但是其叶片功能已经衰老,说明“常绿”突变体中叶绿素降解的过程发生了障碍,*I* 基因的作用是调控叶绿素的降解过程<sup>[24-26]</sup>。

在植物中,被发现与“常绿”突变性状有关的基因有 *PaO*、*NYC1*、*SGR* 等几个基因<sup>[9]</sup>。Armstead 等<sup>[24]</sup>首先发现水稻常绿蛋白基因 *SGR* 在豌豆中的同源基因和 *I* 基因紧密连锁,应用 Northern 杂交分析发现 *ii* 突变体中 *SGR* 蛋白的表达量很低。Sato 等<sup>[25, 27]</sup>进一步研究表明,豌豆 *I* 基因就是为其 *SGR* 蛋白编码的基因,随后,他们克隆了 *I* 基因,并解析了 *I* 基因调控叶绿素降解过程的分子机理,发现 *I* 基因编码的 *SGR* 蛋白是一种正调控因子。*I* 基因突变为 *i* 后, *SGR<sup>i</sup>* 蛋白上有 3 个位点发生突变:第 12 位由苏氨酸变为丝氨酸,第 38 位由天冬氨酸变为赖氨酸,但这两个氨基酸的替换都出现在转运肽区段上,这两个点突变没有表现出功能上的差异;第 188 和 189 位氨基酸是非常保守的区段,之间插入了异亮氨酸和亮氨酸而使其调控功能显著降低。Sato 等<sup>[25]</sup>还发现 *I* 基因存在另外 2 种不同的隐性突变等位基因,其中一个表达为长度截短的 *SGR* 蛋白而丧失调控功能,另一个根本就没有 *SGR* 蛋白的表达而表现为隐性。

Sato 等<sup>[25, 27]</sup>在水稻中分析了这个基因的功能。*OsCHL* 和 *NYC1* 是分别编码叶绿素 *a* 和叶绿素 *b* 降解途径中第一个酶的基因。Sato 等<sup>[25, 27]</sup>发现 *OsCHL* 和 *NYC1* 的表达在水稻“常绿”突变体 *sgr-2* 中没有受到影响,由此推测 *SGR* 蛋白是在翻译水平或翻译后水平调控叶绿素降解相关的酶功能。Aubry 等<sup>[26]</sup>认为在叶片衰老过程中 *SGR* 蛋白促进捕光复合体的解体,叶绿素与蛋白质分离后进入降解过程,但是其详细的作用机制仍有待研究。

### 1.4 花的颜色

野生型豌豆开红花,是因为花瓣中花色素苷的

积累,*A* 基因对于花色素苷的合成是必需的<sup>[28]</sup>。由于液泡 pH 值的变化,或者由于每种花色素苷中化学基团的不同,尤其在羟基或糖基存在的情况下,野生型豌豆的花也有紫色或蓝色<sup>[29]</sup>。*A* 突变为 *a* 后,豌豆开白花,花瓣中没有任何花色素苷的积累。由于基因的多效性,突变型豌豆的种皮颜色也由褐色突变为白色。花色素苷是黄酮类化合物的一种。Harker 等<sup>[30]</sup>发现查尔酮合成酶(*CHS*)是黄酮类化合物合成的关键酶,豌豆中该酶由 *CHS* 基因家族的 3 个基因决定。Harker 等<sup>[30]</sup>还指出 *A* 基因是调控 *CHS* 基因家族基因时空表达的一个关键调控因子。

尽管没有豌豆基因组测序计划,但豌豆基因组与一种已被测序的豆科植物蒺藜状苜蓿(*Medicago truncatula* L.)存在广泛的共线性<sup>[31]</sup>。Hellans 等<sup>[8]</sup>通过比较基因组学,发现 *A* 基因并不编码与花色素苷合成过程有关的基因,而是编码一个 bHLH 转录调控因子,该因子调控黄酮类化合物合成早期步骤的酶基因的转录。他们克隆了 *A* 基因,测序分析发现 *A* 和 *a* 之间存在着 16 个单核苷酸多态性(SNPs)的变异,其中有 3 个 SNPs 导致发生了氨基酸的替换,但这 3 个氨基酸的替换在有色豌豆品系和无色豌豆品系中都有发现;有 13 个 SNPs 是沉默突变,其中有一个沉默突变只在无色品系中存在,即第六内含子剪切供位上的 G 转换为 A,是基因功能突变的原因。正常剪切的内含子供位上的识别序列由 GT 突变为白花品系的 AT,剪切体识别下一个 GT 序列从而在突变体中发生错误的剪接,使其 mRNA 上增加了 8 个核苷酸,由于移码突变而提前出现了一个终止密码子,蛋白质序列截短而失去应有的调控功能。为了证明 *A* 基因的功能,Hellans 等还进行了基因枪瞬时转化白色花瓣的实验。他们将含有野生型豌豆 *A* 基因的 BAC 克隆、或矮牵牛的 *A* 基因同系物利用基因枪法转入白色花瓣,会出现红色斑点,但是转入含 *a* 基因的 BAC 克隆则没有有色斑点出现。

Hellans 等<sup>[8]</sup>还在来自非洲的白花品种中发现了 *a* 基因的第 2 个稀有突变等位基因。这个突变的发生是由于在第六外显子中插入了 1 bp,引起移码突变,提前出现一个终止密码子,使蛋白质序列变短而发生功能变异。

### 1.5 未成熟豆荚的颜色

与子叶颜色不同,野生型豌豆未成熟豆荚的颜



色是绿色, 控制该性状的基因是 *Gp*; 而突变体 (*gpgp*) 未成熟豆荚的颜色是黄色<sup>[16]</sup>。Price 等<sup>[32]</sup>研究了突变性状形成的形态解剖和生理学基础。他们发现突变型豌豆未成熟豆荚的中果皮细胞中叶绿体内膜系统异常, 叶绿体缺少基粒, 表明中果皮细胞中叶绿体的发育受到了影响。但是内果皮细胞叶绿体的结构并没有受到显著影响。未成熟豆荚的中果皮的叶绿素含量仅为野生型的 5%, 中果皮叶绿体结构的变化导致光合能力降低<sup>[33]</sup>。

*Gp* 基因被定位于连锁群<sup>[6]</sup>。豌豆基因组和苜蓿基因组之间存在广泛的共线性, 利用生物信息学的方法, 可以在苜蓿基因组中搜索到 *Gp* 基因定位的区段存在与叶绿体发育和功能有关的基因, 如: *GLK* 基因<sup>[34]</sup>、*LCD1* 基因<sup>[35]</sup>等, 这 2 个基因在豌豆基因组中的同源基因可能是 *Gp* 的候选基因, 值得做进一步的研究和鉴定<sup>[6, 9]</sup>。

## 1.6 花的着生位置

野生型豌豆的花长在主茎轴上, 花沿着主茎分布, 即腋生, White<sup>[16]</sup>用 *Fa* 表示这个性状的基因。其突变体 (*fafa*) 是顶生的, 即花在茎的顶端长成簇状, 并排列成几乎象一个假的伞形花序, 在这种情况下, 茎的上部其切面多少要粗些。花的着生位置决定了种子生长的位置, 在农业上是一个很重要的性状。当花的簇生与一个可以使开花时间同步化的突变联系在一起的时候, 簇生这个性状在育种上非常有价值<sup>[36]</sup>。

一般认为, 植物花器官是由茎顶端分生组织发育而成的, 茎顶端分生组织结构的变异可能导致茎和花的簇生。Clark 等<sup>[37, 38]</sup>在拟南芥中发现了一类突变体, 这类突变体茎顶端分生组织的细胞数量明显增加, 最终导致花的数量增加并产生额外的花器官, 这类突变体被命名为 *CLAVATA*。目前发现了 3 个控制 *CLAVATA* 表型的基因, 分别命名为 *CLV1-3*。基因克隆分析的结果表明, *CLV-1* 基因编码一个典型的受体蛋白激酶, *CLV-1* 是一个跨膜蛋白, *CLV-3* 可能是 *CLV-1* 的一个天然配基。豌豆 *Fa* 基因定位于连锁群<sup>[6]</sup>, 与苜蓿的 8 号染色体有共线性。BLAST 搜索表明在 *Fa* 基因定位的区段有 *CLAVATA* 基因的同源基因, 可能是 *Fa* 的候选基因。

## 1.7 成熟豆荚的形状

野生型豌豆成熟豆荚的形状是膨胀鼓起的, 豆

荚上找不到缢缩, 在其豆荚壁内侧有一层完整的厚壁组织; 突变型豆荚种子之间有缢缩, 有豌豆粒的部位则膨大, 而无豌豆粒的部位则收缩, 形成类似分节的表型。突变型豌豆的豆荚内壁没有厚壁组织, 未成熟豆荚可食用。

现在, 已知有两个基因座 *P* 或 *V* 的突变纯合体可以形成缺少内果皮厚壁组织的表型, 这两种突变体 (*pp* 或 *vv*) 都可食用, 通常叫甜豆。*V* 基因定位于连锁群<sup>[6]</sup>, *P* 定位于连锁群<sup>[6]</sup>, 但不能确定孟德尔应用的突变体究竟是 *p* 还是 *v*<sup>[16]</sup>。*vv* 突变体的内壁只能形成极小斑块的厚壁组织, 而 *pp* 能形成条带状的厚壁组织, 双突变体 *vvpp* 则形成完全没有厚壁组织的表型。根据孟德尔文献中记载的表型推测, 研究者一般倾向于认为孟德尔研究的基因是 *v*<sup>[6]</sup>。但如果孟德尔研究的突变基因是 *v*, 后人将认为他有可能发现连锁现象, 因为 Rasmuson<sup>[39]</sup>发现 *V* 和 *Le* 之间的连锁图距为 12.6 cM, 但是 Blixt<sup>[40]</sup>推测他可能没有进行这两个性状的杂交。

野生型豆荚内壁的厚壁组织由一层木质化的细胞组成, 其形成的原因是细胞停止生长以后次生壁的沉积, 次生壁的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素。在拟南芥中, 与次生壁形成有关的转录因子基因已被克隆<sup>[41]</sup>。*V* 或 *P* 定位的区段都与苜蓿的 2 号染色体存在共线性, 在这个区段能找到与拟南芥次生壁形成有关基因的 3 个同源基因, 这些基因可能是 *V* 或 *P* 的候选基因<sup>[9]</sup>。

## 2 在遗传学教学中的应用

遗传学教学都是从孟德尔定律开始的。遗传学研究的新进展给遗传学课堂教学的内容提出了新的要求<sup>[42, 43]</sup>。孟德尔基因克隆的工作几乎涵盖了基因功能研究最新进展的所有内容, 也说明经典的形式遗传学和现代分子遗传学之间存在着内在联系。案例教学法是提高遗传学课堂教学效果的一种重要教学方法<sup>[44]</sup>。在教学中将孟德尔基因克隆的最新进展作为新的案例引入, 有利于加深学生对遗传学基础知识的理解和掌握, 提高分析和解决遗传学问题的技巧, 全面把握遗传学的内容和发展方向。

### 2.1 加深对基因概念的理解

孟德尔定律被重新发现以后, 贝特生以及当时

的其他学者做了一系列杂交试验,验证了孟德尔规律的正确性和普遍性;但在一些试验中还发现了例外的分离比,促使他们提出了互补基因、叠加基因、累加基因、抑制基因、上位性效应等概念,从而促进了孟德尔比例的深化和发展。实际上,贝特生在香豌豆两对相对性状(花的颜色和花粉粒长度)的杂交试验中已经发现了连锁现象,但他没有给予科学合理的解释。摩尔根在果蝇杂交试验中再次发现性状的连锁现象后,提出了连锁互换规律,使遗传学向前迈进了一大步<sup>[3,4]</sup>。

孟德尔基因克隆的成功再次证明了颗粒式遗传的正确性,同时,现代遗传学的发展也进一步丰富了孟德尔遗传学的内容。孟德尔认为颗粒状的遗传因子是以一个整体传递给子代,摩尔根认为基因是“三位一体”的:基因是一个功能单位、突变单位和重组单位。但本泽尔在噬菌体的遗传研究中发现了基因内交换,说明基因是一个功能单位,但不是最小的突变和重组单位。分子遗传学发展起来后,操纵基因、断裂基因、重叠基因、假基因和转座子等概念的提出进一步加深了人们对基因概念的理解<sup>[3,4]</sup>。

孟德尔基因克隆的成功加深了人们对基因功能的多样性和基因突变在分子水平上的原因多样性的认识(表 1),以及在分子水平上加深了人们对显性、隐性实质的理解。已被克隆的 4 个豌豆性状的显性基因和隐性基因都有非常相似的 DNA 序列,但在一个基因的杂合体中,隐性基因不表达或表达量显著降低;或者隐性基因表达,但形成无功能的蛋白质或功能显著降低的蛋白质,从而使隐性性状被遮盖,在杂合体中只表现出显性性状。

孟德尔是非常幸运的,他研究的 7 对相对性状的差异都非常明显,都是简单遗传的。但实际上,植物的大多数性状如株高、生育期、产量和品质等都是数量遗传性状,这类性状是连续分布的,受多基因的控制,控制数量性状的基因通常称为数量性状基因座(QTL)。随着分子遗传学的发展,借助于高密度的分子标记连锁图、合适的分离群体和有效的统计分析方法,人们可以把复杂的数量性状分解为一个一个简单的孟德尔因子<sup>[45]</sup>。一些重要的农作物如水稻,抽穗期 QTL、粒形和粒重的 QTL 等已被克隆和测序,相关的研究成果已开始应用于水稻的分子设计育种<sup>[45,46]</sup>。孟德尔如果知道这样的发现,定然会

觉得非常欣慰。

4 个孟德尔基因的克隆应用了多种多样的分子生物技术:如 cDNA 文库的筛选技术<sup>[7,21]</sup>、基因的共分离分析<sup>[7,21,24,25]</sup>、基因的共线性和候选基因分析<sup>[8]</sup>等。应用比较基因组学的方法可以在苜蓿基因组中初步搜索到另外 3 个未克隆孟德尔基因的候选基因,相信应用类似于豌豆花色基因克隆的候选基因分析法,这 3 个豌豆基因将会很快被克隆。虽然 4 个孟德尔基因已被克隆和测序,但在理论和实践上仍有许多问题值得深入研究,例如这 4 个基因表达调控的机理,和其他基因、蛋白质的互作等,进一步在更深的层次上阐明这些基因的作用机理,将有助于育种实践。

## 2.2 培养学生严密的科研思维和严谨的实验态度

孟德尔基因克隆的过程是正向遗传学的典范。孟德尔应用数理统计学的方法分析杂交试验的数据,发现性状的分离比以后提出了遗传学的基本规律,再加上严密设计的测交验证构成了一个严谨的逻辑推理体系,孟德尔的研究方法通常称为“假说-演绎法”。孟德尔创立的这种从鉴定突变体入手来研究遗传现象的方法是正向遗传学常用的研究方法。具体地讲,正向遗传学是在已有突变体的前提下,通过杂交等手段研究品种表型的变化,并推测遗传基因的组成和基因在染色体上的位置,再用分子生物学技术克隆和测序基因,其认知路线是由表及里。反向遗传学是在已知基因序列的基础上,利用现代分子生物学的理论和技术,通过核苷酸序列的突变、插入和缺失等手段在基因水平上创造突变体并研究其表型效应,从而分析鉴定基因功能。反向遗传学的认知路线是由里及表,即直接从生物的遗传物质入手来研究基因的生物学功能。在教学中讲清楚正向遗传学的逻辑推理方法和反向遗传学的技术路线,对培养学生严密的科研思维是非常重要的。

孟德尔一对相对性状的杂交试验中, $F_2$ 代显、隐性性状的理论分离比为 3:1。但他的实际试验数据太过于接近 3:1,对于他的数据是否经过修饰,令后人产生了许多猜测和争论<sup>[47]</sup>。孟德尔研究的 7 个基因分别位于豌豆的 5 个不同的连锁群上,其中有几个基因的连锁距离可能很近,但是孟德尔为什么没有发现连锁现象?这个问题也引起了诸多学者的讨

论<sup>[40-47]</sup>。但孟德尔的论文中两对基因的杂交试验应用的性状是子叶颜色和种子形状, 3对基因的试验应用的性状是子叶颜色、种子形状和花的颜色<sup>[1]</sup>, 控制这3个性状的基因分别位于不同的连锁群(表1)。对于孟德尔为什么没有发现连锁现象, 高冀之<sup>[47]</sup>认为: 孟德尔的论文中没有报告, 我们也不能妄加猜测。孟德尔的实验数据曾经遭受过质疑, 可以将这一点作为课堂讨论的素材, 教育学生做好实验记录, 在科学实验中培养严谨的实验态度。

在当代生命科学的研究中, 只要涉及重要生命现象的课题都离不开对基因及其作用的分析。孟德尔基因的克隆及其功能分析是分子遗传学深入发展的必然结果, 也是生命科学研究的一个很好的范例, 笔者认为将这些内容补充进遗传学课堂教学很有必要。豌豆皱缩的分子机理被编入了中学生物学教材, 在教学中发挥了应有的作用。笔者建议将孟德尔基因克隆的内容编入大学遗传学教材, 促进遗传学教学内容的更新, 这将有助于解决遗传学教学与科研进展相对滞后的矛盾。

#### 参考文献(References):

- [1] 孟德尔, 格雷戈. 植物杂交的试验. 梁宏, 王斌译. 见: 遗传学经典论文集. 北京: 科学出版社, 1984: 5-20. [DOI](#)
- [2] Baterson W. Experiments in plant hybridization by Gregor Mendel. *J R Hort Soc*, 1901, 24(1): 1-32.
- [3] 刘祖洞, 江绍慧. 遗传学(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1990: 1-4. [DOI](#)
- [4] 戴灼华, 王亚馥, 粟翼玟. 遗传学(第二版). 北京: 高等教育出版社, 2008: 1-12. [DOI](#)
- [5] 周荣家. 遗传学—理解生命系统——第20届国际遗传学大会在德国柏林召开. 遗传, 2008, 30(9): 1237-1238. [DOI](#)
- [6] Reid JB, Ross JJ. Mendel's genes: toward a full molecular characterization. *Genetics*, 2011, 189(1): 3-10. [DOI](#)
- [7] Bhattacharyya MK, Smith AM, Ellis THN, Hedley C, Martin C. The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell*, 1990, 60(1): 115-122. [DOI](#)
- [8] Hellens RP, Moreau C, Wang KL, Schwinn EK, Thomson JS, Fiers MWEJ, Frew TJ, Murray RS, Hofer JMI, Jacobs JM, Davies KM, Allan AC, Bendahmane A, Coyne CJ, Vaughan MG, Ellis THN. Identification of Mendel's white flower character. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13230, 1-8. [DOI](#)
- [9] Ellis THN, Hofer JM, Vaughan GM, Coyne JC, Hellens RP. Mendel, 150 years on. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(11): 1360-1385. [DOI](#)
- [10] Gregory RP. The seed characters of *Pisum sativum*. *New Phytol*, 1903, 2(10): 226-228. [DOI](#)
- [11] Greenwood CT, Thomson J. Studies on the biosynthesis of starch granules. II. The properties of the components of starches from smooth- and wrinkled-seeded peas during growth. *Biochem J*, 1962, 82(1): 156-164. [DOI](#)
- [12] Matters GL, Boyer CD. Soluble starch synthases and starch branching enzymes from cotyledons of smooth- and wrinkled-seeded lines of *Pisum sativum* L. *Biochem Genet*, 1982, 20(9-10): 833-848. [DOI](#)
- [13] Hedley CL, Smith CM, Ambrose MJ, Cook S, Wang TL. An analysis of seed development in *Pisum sativum*. II. The effect of the *r*-locus on the growth and development of the seed. *Ann Bot*, 1986, 58(3): 371-379. [DOI](#)
- [14] Edwards J, Green JH, Rees TA. Activity of branching enzyme as a cardinal feature of the *Ra* locus in *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, 1988, 27(6): 1615-1620. [DOI](#)
- [15] Smith AM. Major differences in isoforms of starch-branching enzyme between developing embryos of round- and wrinkled-seeded peas (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 1988, 175(2): 270-279. [DOI](#)
- [16] White OE. Studies of inheritance in *Pisum*. II. The present state of knowledge of heredity and variation in peas. *Proc Am Philos Soc*, 1917, 56(7): 487-588. [DOI](#)
- [17] Brian PW, Hemming HG. The effect of gibberellic acid on shoot growth of pea seedlings. *Physiol Plant*, 1955, 8(3): 669-681. [DOI](#)
- [18] Ingram TJ, Reid JB. Internode length in *Pisum*. Gene *na* may block gibberellin synthesis between ent-7 $\alpha$ -hydroxykaurenoic acid and gibberellin A12-aldehyde. *Plant Physiol*, 1987, 83(4): 1048-1053. [DOI](#)
- [19] Ross JJ, Reid JB, Gaskin P, MacMillan J. Internode length in *Pisum*. Estimation of GA1 levels in genotypes *Le*, *le* and *le<sup>d</sup>*. *Physiol Plant*, 1989, 76(2): 173-176. [DOI](#)
- [20] Proebsting WM, Hedden P, Lewis MJ, Croker SJ, Proebsting LN. Gibberellin concentration and transport in genetic lines of pea: effects of grafting. *Plant Physiol*, 1992, 100(3): 1354-1360. [DOI](#)
- [21] Lester DR, Ross JJ, Davies PJ, Reid JB. Mendel's stem length gene (*Le*) encodes gibberellin 3 beta-Hydroxylase. *Plant Cell*, 1997, 9(8): 1435-1443. [DOI](#)
- [22] Martin DN, Proebsting WM, Hedden P. Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the *Le* alleles and function of the expressed proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(16): 8907-8911. [DOI](#)
- [23] Lester DR, Mackenzie-Hose AK, Davies PJ, Ross JJ, Reid



- JB. The influence of the null *le-2* mutation on gibberellin levels in developing pea seeds. *Plant Growth Regul*, 1999, 27(2): 83–89. [DOI](#)
- [24] Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L, Thomas A, Weeden N, Thomas H, King I. Cross-species identification of Mendel's *I* locus. *Science*, 2007, 315(5808): 73. [DOI](#)
- [25] Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H, Kusaba M. Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(35): 14169–14174. [DOI](#)
- [26] Aubry S, Mani J, Hörttensteiner S. Stay-green protein, defective in Mendel's green cotyledon mutant, acts independent and upstream of pheophorbide a oxygenase in the chlorophyll catabolic pathway. *Plant Mol Biol*, 2008, 67(3): 243–256. [DOI](#)
- [27] Sato Y, Morita R, Katsuma S, Nishimura M, Tanaka A, Kusaba M. Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J*, 2009, 57(1): 120–131. [DOI](#)
- [28] Statham CM, Crowden RK, Harborne JB. Biochemical genetics of pigmentation in *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, 1972, 11(3): 1083–1088. [DOI](#)
- [29] Yoshida K, Mori M, Kondo T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(7): 884–915. [DOI](#)
- [30] Harker CL, Ellis THN, Coen ES. Identification and genetic regulation of the chalcone synthase multigene family in pea. *Plant Cell*, 1990, 2(3): 185–194. [DOI](#)
- [31] Kalo P, Seres A, Taylor SA, Jakab J, Kevei Z, Kereszt A, Endre G, Ellis THN, Kiss GB. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol Genet and Genomics*, 2004, 272(3): 235–246. [DOI](#)
- [32] Price DN, Smith CM, Hedley CL. The effect of the *gp* gene on fruit development in *Pisum sativum* L. I. Structural and physical aspects. *New Phytol*, 1988, 110(2): 261–269. [DOI](#)
- [33] Price DN, Hedley CL. The effect of the *gp* gene on fruit development in *Pisum sativum* L. II. Photosynthetic implications. *New Phytol*, 1988, 110(2): 271–277. [DOI](#)
- [34] Waters MT, Moylan EC, Langdale JA. *GLK* transcription factors regulate chloroplast development in a cell autonomous manner. *Plant J*, 2008, 56(3): 432–444. [DOI](#)
- [35] Barth C, Conklin PL. The lower cell density of leaf parenchyma in the *Arabidopsis thaliana* mutant *lcd1-1* is associated with increased sensitivity to ozone and virulent *Pseudomonas syringae*. *Plant J*, 2003, 35(2): 206–218. [DOI](#)
- [36] Weller JL, Hecht V, Liew LC, Sussmilch CF, Wenden B, Knowles LC, Schoor JKV. Update on the genetic control of flowering in garden pea. *J Exp Bot*, 2009, 60(9): 2493–2499. [DOI](#)
- [37] Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting same processes as *CLAVATA1*. *Development*, 1995, 121(7): 2057–2067. [DOI](#)
- [38] Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 1997, 89(4): 575–585. [DOI](#)
- [39] Rasmusson J. Genetically changed linkage values in *Pisum*. *Hereditas*, 1927, 10(1-2): 1–150. [DOI](#)
- [40] Blixt S. Why didn't Gregor Mendel find linkage? *Nature*, 1975, 256(5514): 206. [DOI](#)
- [41] Zhong RQ, Lee CH, Zhou JL, McCarthy RL, Ye ZH. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20(10): 2763–2782. [DOI](#)
- [42] 皮妍, 林娟, 侯嵘, 沈大棱, 蒋科技, 乔守怡. 国内高校遗传学教材发展研究. *遗传*, 2009, 31(1): 109–112. [DOI](#)
- [43] 何风华, 黎杰强, 朱碧岩, 高峰. 遗传学实验课中对生学业评价的改革与实践. 见: 张飞雄, 李绍武主编. 高等院校遗传学教学改革探索. 北京: 化学工业出版社, 2010: 252–255. [DOI](#)
- [44] 李雅轩, 赵昕, 张飞雄, 胡英考, 晏月明, 蔡民华, 李小辉. 案例在遗传与优生教学中的应用. *遗传*, 2012, 34(5): 647–650. [DOI](#)
- [45] 何风华. 水稻 QTL 分析的研究进展. *西北植物学报*, 2004, 24(11): 2163–2169. [DOI](#)
- [46] Wang SK, Wu K, Yuan QB, Liu XY, Liu ZB, Lin XY, Zeng RZ, Zhu HT, Dong GJ, Qian Q, Zhang GQ, Fu XD. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 950–954. [DOI](#)
- [47] 高冀之. 迷人的基因——遗传学往事的文化启迪. 上海: 上海教育出版社, 2007: 19–25. [DOI](#)