

## Лекція 1. Предмет, задачі, об'єкти та методи досліджень онтогенетики.

1. Поняття та характеристика типів онтогенезу.
2. Реалізація генотипу в онтогенезі
3. Предмет та цілі онтогенетики.
4. Методи онтогенетики.

**Ембріональний розвиток, або ембріогенез**, - це складний і тривалий морфогенетичний процес, в ході якого із зиготи формується новий багатоклітинний організм, здатний до самостійної життєдіяльності в умовах довкілля.

Наприклад, щоб уявити масштаб процесів, що відбуваються у розвитку людини, досить згадати, що яйцеклітина людини діаметром 0,15 мм запліднюється спермієм діаметром 0,005 мм, загальна вага заплідненого яйця становить лише  $5 \times 10^{-9}$  г. Доношений плід народжується із середнім розміром 50 см та вагою 3400 г. Від зиготи до народження вага плода зростає приблизно у мільярд раз.

Індивідуальний розвиток організмів є предметом дослідження багатьох біологічних наук: ембріології (біології індивідуального розвитку), фізіології, біохімії, гістології, цитології, цитогенетики та генетики. Кожна з цих наук, використовуючи свої методи, вивчає різні сторони та закономірності індивідуального розвитку.

У поняття онтогенезу включають гаметогенез і процес розвитку, який починається з акту запліднення і закінчується смертю організму. У процесі розвитку відбувається 1) зростання та проліферація (розмноження) клітин, 2) диференціація клітин та тканин і 3) морфогенез, тобто розвиток органів та систем.

Для з'ясування генетичних засад індивідуального розвитку необхідно враховувати низку загальних положень:

1. Онтогенез багатоклітинних організмів є складною послідовністю змін, контрольованих генами. Це регульована реалізація в конкретних умовах генетичної програми розвитку, яка міститься в цитоплазмі та генотипі зиготи.

2. Кожен організм в ембріогенезі тією чи іншою мірою проходить фази розвитку, характерні для його предків, що свідчить про генетичну обумовленість загального плану розвитку організмів.

3. В основі індивідуального розвитку багатоклітинних організмів лежить генетична детермінація та диференціація окремих клітинних клонів, що виникають внаслідок дроблення зиготи та подальших мітотичних поділів.

**Диференціація** - це набуття клітинами здатності виконувати специфічну функцію. **Генетична детермінація** клітин настає ще до диференціації і є стадією розвитку, після якої клітина втрачає здатність диференціюватися в напрямку, не передбаченому генетичною детермінацією.

4. Характерні для розвитку процеси росту, диференціації та морфогенезу є нерівномірними: у період зростання переважають процеси, що

сприяють мітотичній активності клітин (проліферації), а диференціація та морфогенез здійснюються на тлі високої активності інших генів, що забезпечують синтез специфічних білків, необхідних для формоутворюючих процесів. Зростання і проліферація клітин обумовлюються функцією про загальноклітинних генів («генів домашнього господарства»), а диференціація і морфогенез – активністю тканеспецифічних генів («генів розкоші»).

5. Диференціація соматичних клітин та тканин може бути оборотною та незворотною залежно від ступеня генетичної спеціалізації ядер та цитоплазми в клітинах. Буває, що окрема клітина або група клітин диференційованої тканини зберігають здатність шляхом зворотної дедиференціації та подальшої нової диференціації відновити цілий організм або його частину. Здатність клітин до такого оборотного диференціювання називається **тотипотентністю**. Соматичні клітини, що пройшли певний критичний кордон своєї диференціації, втрачають тотипотентність і не здатні до регенерації.

6. В онтогенезі існують так звані критичні періоди, які зазвичай припадають на час інтенсивної ембріональної диференціації або вираженого морфогенезу. У цей період проявляється найбільша чутливість організмів до дії зовнішніх факторів, за допомогою яких можна викликати характерні для стадії розвитку зміни (мутації, фенкопії, морфози). При чому в різних організмів, що знаходяться на тому самому критичному періоді розвитку, за допомогою ушкоджуючих факторів можна викликати однотипні мутації і морфози. Це свідчить про диференціальну активність генів на різних етапах онтогенезу.

7. Детермінація та диференціація клітин в абсолютній більшості випадків не пов'язана з кількісними чи якісними змінами геномів і базуються значною мірою на **епігенетичній спадковості**. Суть її полягає у постійному відтворенні у ряді поколінь соматичних клітин такої надмолекулярної регуляції функцій хромосом, яка дозволяє експресуватися строго певним набором генів у кожному типі клітин.

**Цілісність та дискретність онтогенезу.** Онтогенез особини починається з її утворення. Цією подією особини може бути проростання спори, утворення зиготи, початок дроблення зиготи, виникнення особини тим чи іншим шляхом при вегетативному розмноженні (іноді початок онтогенезу відносять до утворення вихідних клітин, наприклад оогоній). У ході онтогенезу відбуваються зростання, диференціювання та інтеграція елементів організму, що розвивається. Онтогенез особини може завершитися її фізичною смертю або відтворенням (зокрема, при розмноженні шляхом поділу).

Кожен організм у період індивідуального розвитку являє собою цілісну систему, отже, і онтогенез – це цілісний процес, який не може бути розкладений на прості складові частини без втрати якості. Проте існує морфологічна та функціональна дискретність онтогенезу, обумовлена дискретною генетичною детермінацією. Реалізація генотипу в онтогенезі

мінлива і відбувається пристосовано до конкретних умов середовища. Таким чином, генотип здатний забезпечувати в певних межах мінливість онтогенезу в залежності від умов зовнішнього середовища. Ступінь можливої мінливості в ході реалізації генотипу називається **нормою реакції** та виражається сукупністю можливих фенотипів за різних умов середовища. Це визначає так звану **онтогенетичну адаптацію**, що забезпечує виживання та репродукцію організмів іноді навіть за значних змін зовнішнього середовища.

**Необоротність онтогенезу.** Онтогенез рослин та тварин складається з якісно різних періодів: ембріогенез, юність, зрілість та старість. Онтогенез багатоклітинних організмів супроводжується низкою загальних основних процесів: – ріст – збільшення числа клітин та/або їх обсягу (розтягування);

– гістогенез – утворення та диференціювання тканин;

– органогенез – утворення органів та систем органів;

– морфогенез – формування внутрішніх та зовнішніх морфологічних ознак;

- Фізіолого-біохімічні перетворення.

Все це відбувається на основі біохімічної, фізіологічної, генетичної та морфологічної диференціювання клітин, тканин та органів. У результаті онтогенезу виникає низка особливостей, які забезпечують пристосування організму до довкілля.

Онтогенез включає дві групи процесів: морфогенез та відтворення (репродукцію). При дотриманні принципів дискретності та незворотності онтогенезу особина спочатку повинна використовувати енергію для здійснення морфогенетичних процесів, і лише після досягнення зрілості – для відтворення.

### **Основні типи онтогенезу за наявності складних життєвих циклів:**

Існує безліч основних типів онтогенезу та ще більше похідних типів, наприклад:

– Онтогенез організмів з безстатевим розмноженням та/або при зиготному мейозі (прокаріоти та деякі нижчі еукаріоти).

- Онтогенез організмів з чергуванням ядерних фаз при споровому мейозі (більшість рослин та грибів).

– Онтогенез із чергуванням статевого та безстатевого розмноження без зміни ядерних фаз. Чергування поколінь зі статевим та безстатевим розмноженням у Кишкковопорожнинних називається *метагенезом*. Чергування партеногенетичного та амфіміктичного поколінь у черв'яків, деяких членистоногих та нижчих хордових називається *гетерогонією*.

- Онтогенез з наявністю личинкових та проміжних стадій: від первинно-личинкового анаморфозу до повного метаморфозу.

– Онтогенез із втратою личинкових стадій та/або стадій безстатевого розмноження: прісноводні гідри, олігохети, наземні та вторинно-водні черевоногі молюски.

- Онтогенез зі втратою кінцевих стадій та розмноженням на ранніх етапах онтогенезу; проявляється у вигляді педоморфозів (збереженні личинкових рис) та неотенії (розмноження на личинковій стадії).

### **Особливості онтогенезу у тварин.**

У тварин важливу роль у регуляції онтогенетичних процесів відіграють ендокринна та нервова системи. В онтогенезі вищих тварин виділяють такі етапи (періоди) онтогенезу:

- передзародковий (преембріональний) – розвиток статевих клітин (гаметогенез) та запліднення;
- зародковий (ембріональний) – розвиток організму під захистом яйцевих та зародкових оболонок або під захистом материнського організму;
- післязародковий (постембріональний) – до досягнення статевої зрілості;
- дорослий стан - розмноження, турбота про потомство, старіння і загибель.

У межах ембріонального періоду розрізняють такі типи онтогенезу:

– первинно-личинковий – личинка здатна до самостійного існування (паренхімули губок, планули кишковопорожнинних, трехофори поліхет, пуголовки амфібій);

- неличинковий (яйцекладний) - проходження ранніх етапів гісто- і морфогенезу під захистом яйцевих оболонок (представники губок, кишковопорожнинних, кільчастих черв'яків, ракоподібних і багато інших груп, що втратили первинно-личинкові стадії) і зародкових оболонок (комахи з прямим розвитком) ;

– вторинно-личинковий – характеризується різноманітністю вторинних типів личинок, наприклад, вільноживучі (рідко паразитичні) личинки комах із повним перетворенням;

– внутрішньоутробний – зародок розвивається під захистом материнського організму; при цьому розрізняють яйцевивонародження (морфологічних зв'язків між зародком і материнським організмом не виникає), справжнє живородження (у плацентарних ссавців) та безліч проміжних типів (наприклад, у живородящих акул, у сумчастих ссавців).

Зміна типів ембріонального розвитку підвищує незалежність гісто- та морфогенезу від зовнішнього середовища, сприяє автономізації онтогенезу та можливості виходу в нову адаптивну зону.

### **Особливості онтогенезу у вищих рослин.**

Для рослин характерні життєві цикли із чергуванням статевого та безстатевого поколінь зі зміною ядерних фаз (гаплоїдного гаметофіту та диплоїдного спорофіту), а також вегетативне розмноження кожного з названих поколінь. Залежно від особливостей життєвого циклу зачатком нової особини може вважатися спора, зигота (або – при партеногенезі – яйцеклітина), насіння або вегетативний зачаток (брунька, більш менш

видозмінений пагін тощо). Найбільш повно розроблено вчення про онтогенез у насінневих рослин. Цілісність онтогенезу у цих організмів забезпечується за рахунок утворення та взаємодії фітогормонів, а також за рахунок обміну метаболітами між органами та частинами рослин..

В онтогенезі насінневих рослин виділяють такі періоди:

- передзародковий (преембріональний) – розвиток гаплоїдних структур – мікроспорогенез та утворення пилоквих зерен, мегаспорогенез та утворення ендосперму з архегоніями (у голонасінних) або зародкового мішка (у покритонасінних); запилення та запліднення;

- зародковий (ембріональний) – розвиток насіння із сім'язачатку;

- стадія проростка – проросток утворюється при проростанні насіння та існує за рахунок запасів поживних речовин;

- ювенільна стадія – рослина переходить до самостійного харчування;

- іматурна стадія - відбувається розгалуження стебла, формується коренева система;

- віргінільна стадія - формується загальний вигляд дорослої рослини (габітус); однак генеративні органи відсутні;

- генеративна стадія - на цій стадії відбувається насіннєве розмноження: утворюються генеративні органи: квітки, а потім насіння та плоди; розрізняють три етапи генеративної стадії: рання генеративна стадія, середня та пізня;

- сеньільна стадія - насіннєве розмноження припиняється, і рослина відмирає.

Онтогенез рослин значною мірою залежить від умов довкілля. В результаті вони виробили захисні реакції (період спокою, фотоперіодизм, термоперіодизм), завдяки яким період активної життєдіяльності приурочений до найбільш сприятливої пори року.

### **Циклічність онтогенезу.**

Онтогенез є циклічним процесом. Зовні циклічність проявляється у вигляді повторення морфогенетичних та/або фізіолого-біохімічних процесів. Особливо яскраво ця закономірність проявляється у багаторічних рослин, онтогенез яких має бути адаптований до сезонних змін факторів середовища. Н.П. Кренке розробив теорію циклічного старіння та омолодження рослин в онтогенезі. Відповідно до цієї теорії, розвиток організму є боротьба та єдність протилежних процесів у ньому – старіння та омолодження.

Онтогенез визначається **вихідним потенціалом життєздатності**, що зумовлений генетичними особливостями різних організмів; вихідний потенціал життєздатності є ознакою, що еволюційно склалася. Онтогенетичне старіння виявляється у циклічному зниженні потенціалу життєздатності цих елементів, що неминуче призводить до природної загибелі індивідуума. Омолодження - це новоутворення та розвиток молодих речовин і структур, а також затримка старіння існуючих елементів, але не повернення індивіда або його частин до минулого. Таким чином, циклічність зовсім не означає повернення на попередні етапи онтогенезу; **онтогенез – це**

**процес необоротний.** Уявлення Н.П. Кренке про циклічність онтогенезу широко використовуються у сучасній біології індивідуального розвитку.

## 2. Реалізація генотипу в онтогенезі

### Взаємозв'язок між генотипом та фенотипом в онтогенезі.

Генотип – це генетична програма розвитку, зумовлена історією розвитку виду. Фенотип можна визначити як результат реалізації генотипу в ході онтогенезу за певних умов зовнішнього середовища, для якого характерна система ознак та властивостей організму.

Наприклад, у рослин синтез хлорофілу, який контролюється дією генів, не може відбуватися у темряві, і для цього процесу обов'язкова наявність світла. Подібне спостерігається і при утворенні антоціану: при недостатньому висвітленні гени, які контролюють утворення цього пігменту, діють дуже слабо або зовсім не діють. Відомо, що для нормального розвитку, цвітіння та плодоношення кожен вид рослин на певних етапах онтогенезу потребує певної тривалості світлового дня.

**Експресивність та пенетрантність генів.** В ідеалі кожному генотипу повинен відповідати певний фенотип. Однак така однозначна відповідність зустрічається порівняно рідко. Для кількісного опису неоднозначної відповідності генотипу фенотипу видатний російський генетик Н.В. Тимофеев-Ресовський ввів поняття експресивності та пенетрантності генів.

**Експресивністю** називається ступінь проявлення аналізованої ознаки в організмів з однаковим генотипом. Експресивністю характеризується конкретна особина. Наприклад, у дрозофіл з генотипом *eyeless* (eyeless - безокі) зменшено кількість очних фасеток, але абсолютна кількість фасеток варіює від 0 до 50% від норми (779 фасеток). Тоді експресивність аллеля *eu* при повній відсутності фасеток у особини дорівнює 100%, а у особини з числом фасеток, зменшеним удвічі, – 50%.

**Пенетрантністю** прояви гена називається відношення числа особин, у яких проявляється ця ознака, до загального числа з цим генотипом. Пенетрантність характеризується ознака в однорідній групі особин. При повній пенетрантності (100%) мутантний ген виявляє свою дію у всіх особин, що мають його, а за неповної – лише в деяких. Наприклад, у дрозофіли домінантна мутація *Lobe* (*L*) викликає зменшення розміру очей, проте ця ознака проявляється тільки у 75% осіб; у решти 25% мух – носіїв гена *L* – очі нормальні. Тоді пенетрантність аллелю *L* дорівнює 75%.

Експресивність та пенетрантність часто залежать від умов середовища, в якому розвивається організм: освітлення, температури чи вологості.

Приклад 1. У дрозофіли з генотипом *vgvg* (*vestigial* – залишковий) крила недорозвинені, зародкові, але ця мутація сильніше виявляється при зниженій температурі. (Примітка. Алель *vestigial* має плейотропну дію: призводить до редукції крил, але також до модифікації галтерів, зміни

положення певних щетинок на дорсальній стороні тіла, зниження плодючості та тривалості життя та інших відмінностей мутантних мух від нормальних. Однак з цього не випливає, що ген *vestigial* однаковою мірою може вважатися і геном щетинок, і геном плодючості і т. д.)

Приклад 2. У примули відомий ген забарвлення квітки, дія якого залежить від температури. При температурі 30 ... 35 °С і високій вологості квітки примули виявляються білими, а при низькій температурі - червоними.

Приклад 3. У кроликів фенотипічний прояв гена  $C^h$  при нормальній температурі (~ 20°) виявляється у тому, що при загальному білому забарвленні вуха, ніс, кінчики лап і хвіст виявляються чорними (таке забарвлення називається горностаєвим, або гімалайським). При температурі вище 30° забарвлення кроликів виявляється суцільно білим. Якщо ж будь-яка ділянка тіла, на якій вищипана біла шерсть, систематично охолоджувати, то на ньому виростає чорна шерсть.

Приклад 4. У пшениці (і багатьох інших рослин) добре відомі озимі та ярі форми. Озимі форми, посіяні навесні, зазвичай ростуть, куцяться, але не переходять до колосіння, тобто не розвиваються. Якщо ж насіння озимих форм перед весняним посівом піддати протягом певного часу дії знижених температур при певній вологості (яровізація), то рослини будуть розвиватися за ярим типом і перейдуть до плодоношення.

У розглянутих прикладах експресивність алелів зародкових крил у дрозофіли, білого забарвлення квіток у примули, горностаєвого (гімалайського) забарвлення у кроликів, типу розвитку у злаків залежить від температури. В інших випадках пенетрантність та експресивність визначаються генами-модифікаторами, які створюють генотипне середовище для прояву гена. Значення генетичних факторів у визначенні характеру прояву ознак доводиться ефектом відбору в лініях із не повністю пенетрантними генами. Можна отримати лінії як з різко зниженою пенетрантністю порівняно з вихідною лінією, так і зі 100% пенетрантністю.

Таким чином, у фенотипі ніколи не реалізуються всі генотипічні можливості, тобто фенотип кожної особини є лише окремим випадком прояву її генотипу в певних умовах розвитку. Формування різних варіантів ознаки на основі одного й того ж генотипу називається **поліваріантністю онтогенезу**.

**Морфози та терати.** Нормальним може бути названий такий фенотип, який виникає в оптимальних умовах середовища під контролем нормального або дикого генотипу. Фенотипові відхилення від «дикого типу» утворюють морфози та терати. **Морфози** – це зміни органів, які перешкоджають нормальному функціонуванню організму (наприклад, зрослі квітконосні пагони в кульбаби, зміна конфігурації листя). **Терати** (потворності) призводять до часткової або повної втрати органом його функцій (наприклад, перетворення плодолистків на звичайне листя-трофофіли, тичинок на пелюстки).

Морфози і терати не пов'язані зі змінами в генах, які безпосередньо відповідають за формування аналізованих ознак. Інакше висловлюючись, це результат порушення дії генів. Оскільки генотип залишається незмінним, морфози та терати не успадковуються, проте схильність до появи таких порушень може бути зумовлена особливостями генотипу. Морфози та терати можуть бути обумовлені впливом різних фізичних та хімічних факторів.

Приклад 1. Сіре забарвлення тіла у дрозофіли – нормальна ознака. Якщо личинкам дрозофіли додавати в корм азотнокисле срібло, всі ці личинки розвинуться в мух з жовтим тілом. Але, якщо від цих жовтих мух отримати потомство і вирощувати його на звичайному поживному середовищі, то всі нащадки знову стануть сірими. Отже, у разі «пожовтіння» тіла мух – це не мутація, а морфоз.

Приклад 2. У деяких комах зниження температури викликає розвиток меланістичного забарвлення (почорніння тіла). Якщо від меланізованих форм одержати потомство і вирощувати личинок при нормальному забарвленні, то всі нащадки знову повернуться до початкового забарвлення.

Приклад 3. У 1960-ті роки. у Європі широко використовувався транквілізатор талідомід. Однак у вагітних жінок, які приймали цей препарат, народилося близько 7 тисяч дітей з уродженими каліцтвами (відсутність або деформація вушних раковин, великих пальців на руках, укорочення кінцівок, зміщення стегна; тератогенна дія талідоміду була особливо сильною на 20...36 добу розвитку зародка).

Приклад 4. Деякі косметичні препарати (наприклад, для лікування вугрів) містять аналог вітаміну А (13-цис-ретиноеву кислоту). У 59 вагітних жінок, які використовували ці препарати, народилася 21 дитина з різними каліцтвами, а 12 плодів були спонтанно абортвані (критичним періодом для 13-цис-ретиної кислоти також є 20 ... 35 добу розвитку зародка).

Відхилення від "дикого фенотипу" не завжди є аномаліями. Сільськогосподарська практика показує, що, змінюючи умови вирощування рослин та тварин, можна в широких межах варіювати кінцеві результати без шкоди для самих організмів. Для багатьох видів рослин добре відомі умови вирощування, що забезпечують найбільшу продуктивність. Відомо значення вітамінів та гормонів для онтогенезу тварин, що можна використовувати для регулювання їх індивідуального розвитку. Наприклад, встановлені особливості впливу освітлення і температури на несучість у свійської птиці.

### **Фенокопії та генокопії**

Досить часто при реалізації різних генотипів можуть виникати подібні фенотипи: фенокопії та генокопії.

Термін «фенокопія» використовується в тому випадку, якщо розглядаються «дикий» та мутантний генотипи. Коректне застосування терміна "фенокопія" передбачає, що для одного генотипу даний результат вважається нормальним, а для іншого - аномальним. Фенокопії – це, по суті, морфози та терати. Вони не успадковуються, але успадковується схильність до утворення фенокопій.

Приклад 1. У комах темне забарвлення тіла може бути зумовлене генетично. Однак при низьких температурах з'являються меланістичні форми і у комах з генотипом, який за стандартних умов дає звичайне забарвлення. Тоді морфоз "темне тіло" є фенкопією мутації "темне тіло".

Приклад 2. Ярий тип розвитку злаків обумовлений певним генотипом. Яровізація озимих злаків зумовлена впливом зовнішніх факторів. Тоді розвиток озимих злаків за ярим типом є фенкопією спадково ярих форм.

Термін «генкопія» використовується, якщо розглядається два та більше мутантних генотипу. Наприклад, у дрозофіли яскраво-червоне забарвлення очей забезпечують мутації у різних генах: *v*, *cn*, *st*, *cd*. Тоді дрозофіли з різними генотипами, але яскраво-червоними очима будуть генкопії один одного.

Механізми виникнення генкопій є різними. Наприклад, ланцюжок перетворень вихідної речовини на кінцевий продукт  $X \rightarrow Y \rightarrow Z$  може бути перерваний в результаті мутацій в гені А, що контролює перехід  $X \rightarrow Y$ , або в гені В, що контролює перехід  $Y \rightarrow Z$ .

### **3. Предмет та завдання онтогенетики.**

Розділ генетики, що вивчає дію генів в онтогенезі, називається генетикою індивідуального розвитку, феногенетикою чи онтогенетикою.

Це дуже різнобічний розділ генетики, який включає дослідження в галузі генетики гамет, генетичної детермінації та диференціації клітин, визначення статі та певного фенотипу, взаємодії генів, розвиток систем імунітету, генетичних основ онтогенетичної адаптації і т.д. розділами генетики (генетика статі, генетика поведінки, імуногенетика та ін). Мета всіх напрямків – з'ясувати, як реалізується генетична інформація зиготи у процесі індивідуального розвитку. Адже із зиготи – єдиної клітини виникає складний багатоклітинний організм, що містить сотні різноманітних гісто- та цитотипів. Так, наприклад, тіло дорослої людини містить  $10^{15}$  -  $10^{16}$  клітин, що належать більш ніж до 250 різних типів. Частина клітин (зародкові клітини) відокремлюються з інших ранніх стадіях розвитку та дають початок гонадам, які продукують статеві клітини – гамети. Саме гамети містять всю властиву даному виду генетичну інформацію. І створюють безперервний, потенційно безсмертний зародковий шлях. Соматичні клітини, що виникають з так званих стовбурових клітин, можна розглядати як відгалуження від зародкового шляху, що виникають після запліднення та існують лише певний час.

### **4. Методи онтогенетики.**

Питання, яким чином генетична інформація, характерна для виду, реалізується у процесі індивідуального розвитку та як здійснюється генетичний контроль за виникненням різних тканин та органів з їх різноманітними та дуже складними функціями, є основною проблемою онтогенетики. Успішному вирішенню цієї проблеми дуже сприяє

дослідження мутацій, які впливають ті чи інші етапи розвитку. Виявлено мутації, які контролюють перші поділи зиготи, онкогени, що регулюють ростові процеси, сотні мутацій, що контролюють морфогенез (тобто формування морфологічних ознак) в онтогенезі. Порівняльне вивчення окремих мутантів, у яких порушено різні стадії онтогенезу, дозволяє проаналізувати, як взаємодія різних процесів становить безперервний процес індивідуального розвитку.

На основі генетичного аналізу, що включає схрещування подібних мутацій, сформульовано безліч гіпотез про те, як діють гени, що контролюють розвиток. Однак повноцінне проведення такого аналізу можливе лише на деяких організмах.

Цими організмами є – лабораторна миша – модель для дослідження розвитку всіх ссавців та людини, дрозофіла (*D. melanogaster*) та ґрунтова нематода (*Caenorhabditis elegans*). У рослин – це арабідопсис та рис (дводольні та однодольні відповідно). Найбільш вдалі методики вивчення генетичного контролю розвитку стосуються дрозофіли (об'єкт із 100-річним стажем вивчення) та нематода *Caenorhabditis elegans* - маленька (близько 0,5 - 1 мм у довжину) нематода, що вільно живе. Тіло складається з 959 соматичних і 1000 - 2000 статевих клітин. Загальний план будови в основних рисах такий самий, як і у більшості вищих тварин: подовжене тіло має білатеральну симетрію і складається зі звичайних тканин (нерви, м'язи, кишечник, шкіра. Дорослі особини представлені двома формами - гермафродитами та самцями. При самоzapлiдненні в основному виникають гомозиготні нащадки. Повний цикл розвитку становить близько 3 діб.

Генетичний апарат *C.elegans* так само дуже простий: у 6 парах гомологічних хромосом міститься близько 3000 життєво важливих генів. Гаплоїдний геном містить 80 млн пар нуклеотидів (у 17 разів більше, ніж у *E.coli* та у 38 разів менше, ніж у людини). За допомогою мутаційного аналізу ідентифіковано близько 800 генів. Серед них гени, що впливають на форму та поведінку черв'яків, гени, що кодуєть міозин та гени, що контролюють характер і напрямок розвитку, гени загибелі та довголіття. Тіло нематода прозоре, тому можна прижиттєво спостерігати розподіл, міграцію та диференціювання клітин, а також описати генеалогічні відносини та поведінку всіх клітин, починаючи зі стадії одноклітинного яйця та кінчаючи дорослим тваринам. Соматичні структури тварини утворюються за однією незмінною генеалогічною схемою. Кожна з багатьох клітинних поділів відбувається в строго певний час.

Увагу онтогенетиків щодо розвитку миші багато в чому займає локус *T* завдяки різноманітності мутацій, що виникають у ньому. Рецесивні мутації *t* у гомозиготному стані зупиняють ембріональний розвиток на певних стадіях. Ембріони, гомозиготні по  $t^{12}$ , розвиваються до стадії морули, інші алелі у гомозиготному стані блокують наступні стадії розвитку. Гетерозиготи *Tt* являють собою збалансовані літали і дозволяють зберегти мутації *t* для подальшого вивчення. Аналіз комплементарності алелів є одним із основних генетичних методів з'ясування їх ролі в ембріогенезі мишей. Існує гіпотеза,

що різні алелі *t* по-різному впливають на антигенні властивості клітинних мембран ембріонів і, як наслідок, на утворення асоціацій клітин у процесі розвитку.

На жаль, кількість виявлених спонтанних мутацій, що впливають на розвиток миші, недостатня для повного вивчення складного індивідуального розвитку ссавців. Тому мутантів отримують штучно та вивчають функцію їх генотипів за допомогою молекулярно-генетичних та біотехнологічних методів.

У 2006 р. американські вчені Енжрю Файр та Крейг Меллоу отримали Нобелівську премію за відкриття способу специфічного виключення генів у клітинах – метод РНК-інтерференції. **РНК-інтерференція** - біологічний механізм управління активністю генів за допомогою коротких дволанцюгових РНК (смыслових та антисмыслових) і спеціальних білкових комплексів, що призводить до селективної деградації певних мРНК або інгібування трансляції багатьох мРНК у клітині. Вимикати певні гени у такий спосіб можна навіть на пізніх стадіях розвитку організмів. Суть методу полягає у використанні дволанцюгових міРНК (малі інтерферуючі РНК - siRNA) або штучно синтезованих РНК-олігонуклеотидів, послідовність нуклеотидів у яких відповідає певному фрагменту гена, що підлягає виключенню. При цьому виключення гена здійснюється не шляхом зміни його структури у хромосомі, а шляхом нейтралізації транскрибованих на цьому гені іРНК.

Сама по собі дволанцюжкова РНК інертна і не здатна до подальшого спарювання основ за Вотсон-Криком. Однак вона може виступати тригером РНК-інтерференції завдяки тому, що в клітинах працює потужний і високоспецифічний механізм процесингу дволанцюжкових РНК з перетворенням їх на високоактивні короткі одноланцюгові sРНК довжиною 20-24 нуклеотиду. Вони є агентами РНК-інтерференції, необхідної як для метилювання ДНК та гістонів (вимикання транскрипції), так і для стійкої посттранскрипційної репресії генів (гідроліз мРНК у рослин та пригнічення елонгації та термінації трансляції у тварин), що передається при клітинному поділі як метастабільний стан цитоплазми. Спочатку з молекулою міРНК зв'язується білок AGO1/4, що має активність РНКаз. Білок гідролізує один із ланцюгів дуплексу і міцно з'єднується з іншим ланцюгом. У комплексі з AGO1 зріла одноланцюжкова міРНК здатна викликати вибіркового гідроліз іРНК, а в комплексі з AGO4 – впливати на метилювання хроматину комплементарних їй ділянках ДНК. Внаслідок цих подій блокується функція відповідного структурного гена. Біологічне значення РНК-інтерференції полягає насамперед у захисті клітин від проникнення РНК-вірусів, і навіть від спонтанного мутагенезу, що з ретротранспозиціями. РНК-залежні РНК полімерази можуть збирати другий ланцюг на одноланцюжковій РНК віроїдів, на продуктах транскрипції вірусної ДНК та трансгенів. Сьогодні цей метод вважається перспективним виключення генів будь-якого походження з'ясування ролі цих генів у процесах розвитку. Таким чином, конструюючи різні мРНК можна пригнічувати синтез строго певних білків у клітині, не

змінюючи при цьому структуру генів, що кодують. Вперше блокувати функцію генів цим методом вдалося саме у *Caenorhabditis elegans*.

Ще один метод виключення генів запропонували нобелівські лауреати 2007 р. - М.Капеккі, О. Смітіс та М.Еванс. Метод полягає у введенні в клітини мишей синтезованих та кілька модифікованих дволанцюгових олігонуклеотидів ДНК, які гомологічні тому чи іншому гену і можуть вступати з ним у гомологічну рекомбінацію. При цьому шуканий ген перетворюється на структурно змінену та функціонально неактивну форму (настає «нокаут» гена). **Нокаут гена** – це молекулярно-генетичний метод, у ході якого задумані дослідником зміни вносяться в нуклеотидну послідовність гена, що вивчається, або його регуляторних елементів.

Спрощено схема проведення нокауту гена має такий вигляд: виділяють досліджуваний ген, клонують у складі відповідного плазмідного вектора в клітинах *E.coli*. До складу клонованої послідовності вбудовують селективний маркер (наприклад ген стійкості до антибіотика). Потім ембріональні клітини миші, отримані з бластоцисти і культивуються *in vitro*, вводять рекомбінантну конструкцію і проводять відбір трансгенних клітин. Клітини, стійкі до антибіотика, вводять у мишачий ембріон (бластоцисту), після чого ембріон імплантується в матку спеціально підготовленої самки. Ембріон дає початок химері з мутантних і нормальних клітин. Аналіз фенотипу «нокаутної» моші дає поняття про функцію інактивованого гена.

Миша є найбільш адекватною модельною твариною для використання технології інактивації генів.

Це зумовлено такими причинами: а) миша – добре вивчений та доступний об'єкт;

б) геном миші та людини містить приблизно однакову кількість генів;

в) подібність амінокислотних послідовностей всіх білків людини та миші становить близько 90%. Однак основною причиною використання миші як модель для інактивації гена є можливість ізолювання ембріональних стовбурових клітин, в яких будь-який ген може бути модифікований. Клітинні лінії, що містять модифікований ген, можуть бути привнесені в зародок, що розвивається, що дозволяє отримати химерну тварину, що несе штучно створену мутацію. диференціації. Для отримання таких мишей синтезовані фрагменти ДНК методом електропорації вводили в стовбурові клітини мишей і вимикали певний ген. Такі генетично змінені стовбурові клітини вводили в ембріони мишей та за допомогою сурогатної самки отримували химерних нокаутних мишей, необхідних для дослідження. Тобто, наприклад, знаючи послідовність гена людини, що вивчається, стало можливо за допомогою інактивації гомологічного гена у модельного організму визначити біохімічну і фізіологічну роль його продукту.

((Електропорація заснована на тому, що імпульси високої напруги оборотно збільшують проникність біомембран. У середу для електропорації додають клітини та фрагменти ДНК, які необхідно ввести в клітини. Через середу пропускають високовольтні імпульси (напруга 200 - 350 В, тривалість імпульсу 54 м) що призводять до утворення пор (електропробій) у

цитоплазматичній мембрані, час існування та розмір яких достатні, щоб такі макромолекули, як ДНК, могли з зовнішнього середовища увійти в клітину в результаті дії осмотичних сил, при цьому об'єм клітини збільшується. Показано, що в оптимальних умовах електропорації кількість трансформантів може досягати 80% клітин, що вижили.)).

Широко використовуються в сучасній онтогенетиці методи клітинної біотехнології: трансплантація ядер, окремих хромосом, технології клонування клітин і організмів, злиття клітин різного походження та ін. та цитоплазми в онтогенезі.