



Poglavlje 3. Globalno zatopljenje i uzgoj, biotehnologija u akvakulturi

Prof., Dr. Halyna Krusir

Prof., Dr. Maryna Mardar

Izv. prof. Olha Sahdieieva

Nacionalno tehnološko sveučilište u Odesi

Uvod

Vodeni ekosustavi, ključni za globalnu biološku raznolikost i ljudsku egzistenciju, prolaze kroz neviđene promjene zbog globalnog zatopljenja. Porast temperatura, uzrokovan antropogenim klimatskim promjenama, remeti cikluse razmnožavanja, stope preživljavanja i genetski integritet vodenih organizama. Istodobno, sektor akvakulture suočava se s tim izazovima kroz inovativna biotehnološka rješenja. S obzirom na to da se povećava korištenje vodenih resursa kako bi se zadovoljili zahtjevi sigurnosti hrane, integracija naprednih tehnologija uzgoja, uključujući selektivni uzgoj, genomsku selekciju i uređivanje gena CRISPR/Cas9, nudi transformativni potencijal za rješavanje dvostruke krize klimatskih promjena i održive akvakulture.

Ovo poglavlje zadire u zamršenu interakciju između promjena okoliša i biotehnološkog napretka u akvakulturi. Najprije se istražuje kako globalno zatopljenje utječe na cikluse razmnožavanja i dinamiku preživljavanja vodenih vrsta, uzrokujući značajne promjene u strukturi populacije i funkcijama ekosustava. Fokus se zatim prebacuje na revolucionarna biotehnološka rješenja, kao što su selektivni uzgoj i genomsku selekciju, koja povećavaju otpornost i produktivnost vrsta akvakulture. Nadalje, raspravlja se o revolucionarnoj tehnologiji uređivanja gena CRISPR/Cas9, ističući njezinu primjenu u poboljšanju otpornosti na bolesti, stope rasta i prilagodljivosti okolišu kod različitih vrsta riba. Konačno, ispituju se etička, ekološka i regulatorna razmatranja koja okružuju ove tehnologije, naglašavajući potrebu za održivim i odgovornim inovacijama u akvakulturi.

Implikacije ovih rasprava dalekosežne su i utječu ne samo na budućnost akvakulture, već i na globalne napore za ublažavanje gubitka biološke raznolikosti i utjecaja klimatskih promjena. Ovaj uvod pruža temelj za sveobuhvatnu analizu izazova i prilika koje predstavlja integracija biotehnologije u akvakulturu u sjeni globalnog zatopljenja.

1. Utjecaj globalnog zatopljenja na razmnožavanje vodenih vrsta

1.1. Promjene u ciklusima razmnožavanja: Povećane temperature vode mogu promijeniti cikluse razmnožavanja vodenih vrsta, utječući na vrijeme mriješta, stope rasta i stope preživljavanja ličinki.

Globalno zatopljenje, potaknuto klimatskim promjenama izazvanim ljudskim djelovanjem, ima dubok utjecaj na ekosustave diljem svijeta, uključujući vodeni okoliš. Jedno od najznačajnijih



područja pogođenih porastom temperatura je uzgoj vodenih vrsta. Promjene temperature vode mijenjaju cikluse razmnožavanja, vrijeme mrijesta, stope rasta i stope preživljavanja potomstva, što dovodi do promjena u strukturi i funkcioniranju vodenih populacija. Ovaj pregled literature ima za cilj istražiti kako ove promjene u okolišu utječu na vodene vrste, usredotočujući se na promjene u ciklusima razmnožavanja i genetskoj prilagodbi.

Promjene u uzgojnim ciklusima. Porast temperature vode zbog globalnog zatopljenja jedan je od primarnih pokretača promjena u reproduktivnom ponašanju vodenih vrsta. Mnoge se vrste oslanjaju na specifične temperaturne znakove kako bi započele razmnožavanje. S porastom temperatura, mijenja se vrijeme razmnožavanja, a ti pomaci mogu dovesti do neusklađenosti između vrsta i njihovih staništa.

Vrijeme mrijesta. Studije su pokazale da se mnoge vodene vrste razmnožavaju ranije tijekom godine zbog toplijih temperatura vode. Na primjer, primijećeno je da se vrste riba kao što su atlantski bakalar (*Gadus morhua*) i smuđ (*Perca fluviatilis*) mrijeste ranije u sezoni kao odgovor na povećane temperature vode (Tompkins i sur., 2017.). Iako se raniji mrijest u početku može činiti korisnim, često dovodi do neusklađenosti s dostupnošću resursa hrane za ličinke, jer fitoplankton, primarni izvor hrane za mnoge mlade ribe, možda nije dostupan u isto vrijeme (Durant i sur., 2007.). To može dovesti do smanjenja stope preživljavanja potomaka, što bi dodatno utjecalo na dinamiku populacije.

Štoviše, raniji mrijest ne jamči nužno uspjeh, jer se vrste mogu mrijestiti prije nego što su uvjeti optimalni za preživljavanje ličinki. Neusklađenost u vremenu može smanjiti broj održivih potomaka, što potencijalno dovodi do dugoročnog pada populacije (O'Reilly i sur., 2008).

Stope rasta i metabolički učinci. Povećanje temperature vode također utječe na brzinu metabolizma vodenih vrsta. Toplije temperature obično ubrzavaju rast mnogih vrsta, jer potiču brže metaboličke procese (Angilletta i sur., 2004). Međutim, ovo povećanje stope rasta ne mora uvijek biti korisno. Vrste koje prebrzo rastu u toplijim vodama možda neće razviti potrebnu veličinu ili snagu da prežive u odrasloj dobi, što može dovesti do slabijih jedinki s manjim šansama za uspješnu reprodukciju (Heath i sur., 2014). Osim toga, brži rast nije uvijek u korelaciji s povećanjem reproduktivnog uspjeha, jer se vrsta može suočiti s neusklađenošću u vremenu svojih razvojnih prekretnica i uvjetima okoliša.

Stope preživljavanja ličinki. Rane životne faze vodenih vrsta često su najosjetljivije na promjene u okolišu, a porast temperature vode može dodatno pogoršati te ranjivosti. Povišene temperature mogu smanjiti razinu kisika u vodi, utječući na stopu preživljavanja ličinki, koje zahtijevaju visoke koncentracije kisika za pravilan razvoj (Pörtner i sur., 2014). Nadalje, više temperature mogu stresirati mlade organizme, čineći ih manje otpornima na ekološke izazove, kao što su grabežljivost ili nestašica hrane (Walther i sur., 2002).

1.2. Genetska prilagodba: Neke se vrste mogu genetski prilagoditi promjenjivim temperaturama, dok se druge mogu suočiti sa smanjenim reproduktivnim uspjehom ili padom populacije.

Iako promjene u okolišu uzrokuju izazove vodenim vrstama, neke imaju potencijal genetski se prilagoditi promjenjivim uvjetima. Genetska prilagodba uključuje postupne promjene u genetskom sastavu populacija, omogućujući vrstama da se prilagode stresorima iz okoliša, poput povećanja temperature.



Prilagodba temperaturnim promjenama. Istraživanja su pokazala da su određene vrste pokazale određeni stupanj genetske prilagodbe rastućim temperaturama. Na primjer, studije o atlantskom bakalaru pokazale su dokaze o lokalnoj prilagodbi na različite toplinske uvjete u različitim geografskim područjima. (Jorgensen i sur., 2017.). Neke populacije bakalara koje žive u toplijim vodama razvile su genetske osobine koje im omogućuju uspješan mrijest na višim temperaturama. Slično tome, neke vrste riba mogu pokazivati promjene u reproduktivnom vremenu ili fiziološkoj toleranciji, prilagođavajući se toplijem okruženju tijekom više generacija (Lynch i sur., 2014.).

Međutim, sposobnost vrsta da se genetski prilagode ograničena je čimbenicima kao što su genetska raznolikost i brzina kojom se događaju promjene u okolišu. Vrste s niskom genetskom raznolikošću ili one u staništima koja se brzo zagrijavaju mogu se teško prilagoditi dovoljno brzo da izbjegnu pad populacije (Fischer i sur., 2014.). Nadalje, proces genetske prilagodbe je spor, a brzina zagrijavanja može nadmašiti sposobnost nekih vrsta da se pravovremeno prilagode na pad reproduktivnog uspjeha i smanjenje populacije. Dok se neke vrste mogu uspješno prilagoditi temperaturama zagrijavanja, druge se mogu suočiti s izazovima koji smanjuju njihov reproduktivni uspjeh ili dovode do pada populacije. Na primjer, vrste sa specijaliziranim zahtjevima za uzgoj, poput onih koje se oslanjaju na vrlo specifične temperaturne raspone za mrijest, mogu se teško nositi s brzim temperaturnim promjenama uzrokovanim globalnim zatopljenjem (Parmesan, 2006). U takvim slučajevima reproduktivni uspjeh može se smanjiti, a populacije mogu doživjeti pad broja ili čak lokalno izumiranje.

Vrste koje se genetski ne prilagođavaju rastućim temperaturama možda se neće moći uspješno razmnožavati u svojim izvornim staništima, što rezultira gubitkom genetske raznolikosti i dodatnim smanjenjem njihovih šansi za preživljavanje uslijed klimatskih promjena (Chevin i sur., 2010.).

Utjecaj globalnog zatopljenja na razmnožavanje vodenih vrsta je višestruk, uključujući promjene u ciklusima razmnožavanja, promjene u stopama rasta i promjene u stopama preživljavanja potomstva. Porast temperatura doveo je do ranijeg mrijesta kod mnogih vrsta, ali to može uzrokovati neusklađenost s dostupnošću hrane i optimalnim uvjetima okoliša, što rezultira nižim stopama preživljavanja ličinki. Iako se neke vrste mogu genetski prilagoditi promjenjivim temperaturama, stopa promjena u okolišu može premašiti njihovu sposobnost da to učine, što dovodi do smanjenog reproduktivnog uspjeha i potencijalnog pada populacije. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razumjele dugoročne posljedice ovih promjena na vodene ekosustave i razvile strategije za ublažavanje učinaka klimatskih promjena na ove vrste.

2. Biotehnološki napredak u uzgoju akvakulture

2.1 Selektivni uzgoj: Korištenje tehnika selektivnog uzgoja za razvoj sojeva riba i školjkaša koji su otporniji na više temperature i druge stresove povezane s klimom.

Akvakultura je sektor koji brzo raste i znatno doprinosi globalnoj sigurnosti opskrbe hranom. Kako se klima nastavlja mijenjati, akvakultura se suočava sa sve većim izazovima, kao što su porast temperatura i sve češći ekstremni vremenski događaji. Kako bi se riješili ovi izazovi, biotehnološki napredak, posebno u selektivnom uzgoju i genomskoj selekciji, sve se više primjenjuje za razvoj vrsta akvakulture koje su otpornije na stresove povezane s klimom.



Selektivni uzgoj

Selektivni uzgoj desetljećima je kamen temeljac akvakulture, pomažući u povećanju produktivnosti i otpornosti uzgojenih vrsta. Proces uključuje odabir jedinki s poželjnim osobinama za reprodukciju, čime se postupno poboljšava genetski sastav populacija. Tradicionalni selektivni uzgoj u akvakulturi usredotočio se na osobine kao što su stopa rasta, otpornost na bolesti i učinkovitost pretvorbe hrane. Kako klimatske promjene pojačavaju stresore okoliša, sve je veći naglasak na uzgoju osobina koje daju veću otpornost na povišene temperature vode i druge izazove povezane s klimom.

Istraživanja su pokazala da selektivni uzgoj može pomoći vrstama akvakulture, kao što su ribe i školjke, da se prilagode toplijim okruženjima. Na primjer, istraživanja atlantskog lososa pokazala su da selektivni uzgoj može poboljšati toleranciju na toplinu, potencijalno omogućujući uzgojenim populacijama da prežive u toplijim vodama koje su posljedica klimatskih promjena (Gjøen i sur., 2018.). Nadalje, selektivni programi uzgoja sve se više fokusiraju na osobine poput otpornosti na bolesti i sposobnosti preživljavanja u hipoksičnim uvjetima, koji će vjerojatno postati sve češći kako temperatura vode raste (Houston i sur., 2018.).

Selektivni uzgoj za otpornost na klimu također uključuje poboljšanje osobina ponašanja. Na primjer, ribe koje pokazuju veću toleranciju na stresore kao što su gužva i rukovanje mogu bolje podnijeti teže uvjete stvorene klimatskim promjenama (Huntingford i sur., 2020.). Ovi uzgojni programi imaju za cilj omogućiti vrstama akvakulture da se uspješno prilagode promjenjivoj klimi, pridonoseći dugoročnoj održivosti.

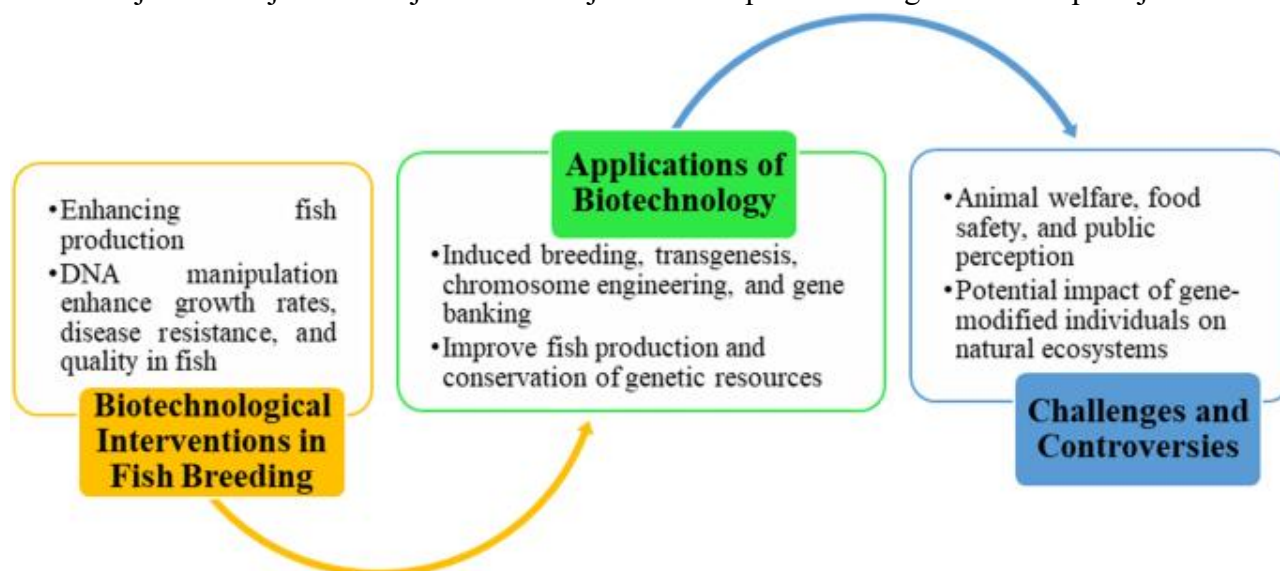
2.2 Genomska selekcija: Implementacija genomskih alata za identifikaciju i širenje poželjnih osobina, povećavajući sposobnost vrsta akvakulture da napreduju u promjenjivoj klimi.

Upotreba moderne biotehnologije za poboljšanje proizvodnje vodenih vrsta ima veliki potencijal ne samo za zadovoljavanje potražnje, već i za poboljšanje akvakulture. Genetska modifikacija i biotehnologija također imaju ogroman potencijal za poboljšanje kvalitete i količine riba koje se uzgajaju u akvakulturi. Kako potražnja za akvakulturom raste, biotehnologija može igrati ključnu ulogu u njezinom zadovoljavanju. Kao i kod svih biotehnološki poboljšanih namirnica, akvakultura će biti strogo regulirana prije odobrenja za tržište. Biotehnološka akvakultura također nudi prednosti za okoliš. Kada se na odgovarajući način integrira s drugim tehnologijama za proizvodnju hrane, poljoprivrednih proizvoda i usluga, biotehnologija može biti od značajne pomoći u zadovoljavanju potreba rastućeg i sve urbaniziranijeg stanovništva u sljedećem tisućljeću. Uspješan razvoj i primjena biotehnologije ovise o širokoj znanstvenoj osnovi koja uključuje biologiju, genetiku, agronomiju, fiziologiju, patologiju, biokemiju te varijacije i metode uzgoja organizama. Napredak novih tehnologija zahtijeva kontinuiranu posvećenost temeljnim istraživanjima. Biotehnološki programi moraju biti čvrsto integrirani u znanstvenu osnovu, jer njihova izolacija može ugroziti njihovu učinkovitost. Na slici 1. prikazana je uloga biotehnologije u povećanju proizvodnje ribe.

Genomska selekcija, koja koristi genomske alate za identifikaciju i širenje poželjnih osobina, predstavlja veliki korak naprijed u uzgoju akvakulture. Ova tehnika uključuje Povezivanje genetskih markera s osobinama od interesa, omogućavajući učinkovitiju selekciju. Genomska selekcija može ubrzati uzgojne programe, omogućujući uzgajivačima da prepoznaju jedinke s najboljim genetskim potencijalom za otpornost na okolišne stresore.



Jedna od najznačajnijih primjena genomske selekcije u akvakulturi je povećanje tolerancije na toplinu. Studija na kalifornijskoj pastrvi (*Oncorhynchus mykiss*) otkrila je da bi se genomska selekcija mogla koristiti za identifikaciju markera povezanih s tolerancijom na toplinu, Omogućujući razvoj sojeva s većom sposobnošću preživljavanja u toplijim vodama (Liu i sur., 2020.). Primjenom genomske selekcije na programe uzgoja, vrste akvakulture mogu biti genetski prilagođene za uspjeh u okruženjima za koja se očekuje da će doživjeti više temperature zbog klimatskih promjena.



Slika 1. Uloga biotehnologije u povećanju proizvodnje ribe (Yang i sur., 2021.).

Osim tolerancije na toplinu, genomska selekcija koristi se za poboljšanje drugih osobina povezanih s klimom, kao što su Otpornost na bolesti i sposobnost preživljavanja u uvjetima s niskom koncentracijom kisika. Na primjer, genomski alati koriste se za identifikaciju genetskih markera povezanih s rezistencijom na patogen *Vibrio anguillarum*, koji predstavlja značajnu prijetnju vrstama akvakulture u toplijim vodama (Vázquez i sur., 2018). Primjenom genomske selekcije za uzgoj riba otpornijih na bolesti, sustavi akvakulture mogu postati održiviji i manje ovisni o antibioticima, koji su sve više pod nadzorom zbog svojeg utjecaja na okoliš.

Genomska selekcija integrira se s tradicionalnim selektivnim uzgojem kako bi se optimizirao genetski dobitak. Kombinacija genomskih informacija s fenotipskim podacima omogućuje uzgajivačima da donesu informiranije odluke o tome koje jedinke odabrati za reprodukciju. Na primjer, genomski podaci mogu se koristiti za predviđanje budućeg učinka potomstva, što pomaže u smanjenju rizika od inbreedinga i očuvanju dugoročnog genetskog zdravlja populacija akvakulture (Gjøen i sur., 2018.).

Integracija selektivnog uzgoja i genomske selekcije

Integracija selektivnog uzgoja i genomske selekcije smatra se snažnom strategijom za osiguravanje otpornosti vrsta akvakulture na klimatske promjene. Selektivni uzgoj pruža čvrste temelje poboljšanjem osobina kao što su stopa rasta i otpornost na bolesti, dok genomska selekcija ubrzava proces i povećava preciznost uzgojnih programa. Zajedno, ove tehnike omogućuju brzi razvoj sojeva koji su bolje prilagođeni promjenjivim uvjetima okoliša.



U slučaju atlantskog lososa, na primjer, korišteni su i selektivni uzgoj i genomska selekcija kako bi se stvorili sojevi koji su otporniji na više temperature i bolesti (Gjøen i sur., 2018.). Kombinacija ova dva pristupa ima potencijal značajno povećati održivost akvakulture razvojem sojeva koji mogu uspjevati u toplijim, promjenjivijim uvjetima okoliša.

Izazovi i budući smjerovi

Iako biotehnološki napredak obećava poboljšanje uzgoja u akvakulturi, postoje izazovi s kojima se treba suočiti. Jedna od ključnih briga je potencijal za genetsku homogenizaciju u uzgojenim populacijama, što može dovesti do depresije inbreedinga i smanjene genetske raznolikosti. Za programe uzgoja ključno je učinkovito upravljati genetskom raznolikošću, osiguravajući da vrste akvakulture ostanu prilagodljive budućim promjenama u okolišu (Houston i sur., 2018.).

Nadalje, provedba genomske selekcije zahtijeva znatna ulaganja u genomske resurse, uključujući razvoj visokokvalitetnih referentnih genoma i genetskih markera. Iako su genomski alati posljednjih godina postali dostupniji, cijena i složenost tih alata i dalje su prepreka za neke industrije akvakulture (Huntingford i sur., 2020.).

Unatoč tim izazovima, kontinuirani razvoj genomskih tehnologija, u kombinaciji s napretkom računalnih alata i strategija uzgoja, ima veliki potencijal za poboljšanje otpornosti vrsta akvakulture na klimatske promjene.

Zaključak

Biotehnološki napredak u uzgoju u akvakulturi, uključujući selektivni uzgoj i genomsku selekciju, nudi obećavajuća rješenja za izazove koje predstavljaju klimatske promjene. Povećanjem otpornosti vrsta akvakulture na rastuće temperature, bolesti i druge stresore iz okoliša, ove tehnologije mogu pomoći u osiguravanju održivosti industrije. Integracija genomske selekcije s tradicionalnim pristupima uzgoju vjerojatno će biti ključna strategija za razvoj sojeva riba i školjkaša otpornijih na klimatske promjene. Budući da se sektor akvakulture i dalje suočava s pritiscima klimatskih promjena, te će biotehnološke inovacije imati ključnu ulogu u osiguravanju da akvakultura ostane održiv i održiv izvor hrane za svjetsko stanovništvo.

3. Genetski inženjering i CRISPR

3.1. Genetski inženjering u akvakulturi

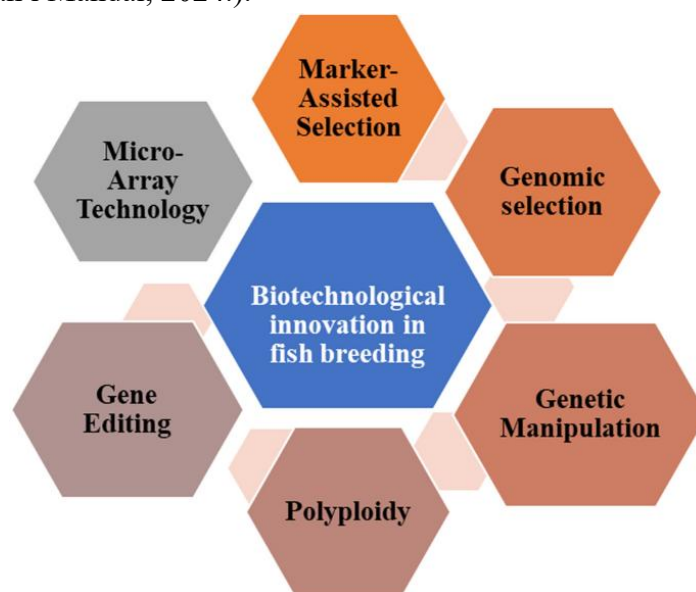
Korištenje biotehnoloških metoda za poboljšanje dobrobiti kultiviranih organizama, povećanje produktivnosti i zaštitu vodenih ekosustava dalo je ohrabrujuće rezultate. Među njima su cjepiva i imunostimulansi, probiotici, prebiotici, simbiotici, paraprobiotici, liječenje fagima, antimikrobni peptidi, genska terapija, RNA interferencija i druge biotehnološke terapije. Genetski napredak u akvakulturi igra ključnu ulogu u povećanju produktivnosti, smanjenju troškova proizvodnje i minimiziranju utjecaja na okoliš.

Primjeri metoda za uređivanje genoma riba uključuju CRISPR-Cas9, efektorske nukleaze slične aktivatoru transkripcije i nukleaze cinkovog prsta. Molekularna biologija i transgeneza, bankarstvo gena, manipulacija kromosomima, hormonski tretmani, uzgoj ribe s jednim ili više roditelja, stvaranje riba s različitim brojem stanica (poliploidne, triploidne, haploidne, ginogenetičke i androgene) te upotreba sintetičkih hormona u uzgoju riba druge su metode koje se koriste u biotehnologiji riba.



Inovacije u biotehnoškim tehnologijama revolucionirale su genetski uzgoj riba, što je dovelo do značajnog napretka u industriji akvakulture (Yang i sur., 2021.).

Tehnike kao što su genetski inženjering i CRISPR-Cas9 omogućile su preciznu modifikaciju genoma riba, što je rezultiralo sojevima s povećanim stopama rasta, otpornošću na bolesti i poboljšanom učinkovitošću pretvorbe hrane. Programi selektivnog uzgoja optimizirani su selekcijom potpomognutom markerima, omogućujući učinkovitiju identifikaciju i razmnožavanje poželjnih genetskih osobina. Nadalje, reproduktivne tehnologije, uključujući mrijest izazvano hormonima i krioprezervaciju spolnih stanica, poboljšale su uspjeh uzgoja i genetsku raznolikost. Ovaj biotehnoški napredak pridonio je održivijim i produktivnijim praksama uzgoja ribe, zadovoljavajući sve veću globalnu potražnju za morskim plodovima. Ovi alati igraju ključnu ulogu u izbjegavanju izumiranja ugroženih vrsta riba i poboljšanju komercijalne proizvodnje ribe. Osim toga, druge biotehnoške metode, kao što su upotreba sintetičkih hormona, proizvodnja monoseksa i transgeneza, doprinose napretku uzgoja riba. Ovi alati igraju glavnu ulogu u sprječavanju izumiranja ugroženih vrsta riba i poboljšanju komercijalne proizvodnje ribe. Osim toga, druge biotehnoške metode, kao što su upotreba sintetičkih hormona, proizvodnja monospolnih osoba i transgeneza, značajno doprinose napretku u uzgoju riba. Na slici 2. prikazane su različite biotehnoške inovacije u uzgoju riba (Sankaran i Mandal, 2024.).



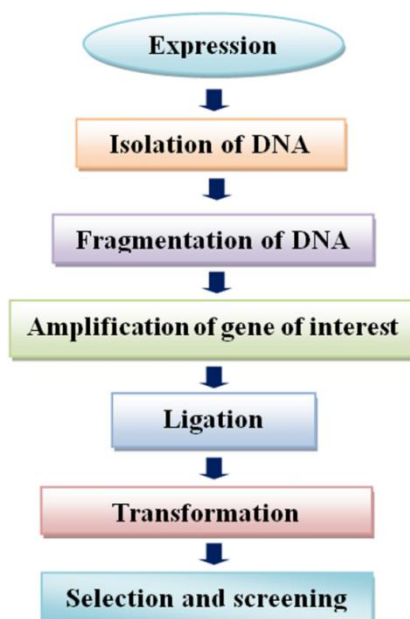
Slika 2. Biotehnoške inovacije u uzgoju ribe

Genetska raznolikost predstavlja značajan resurs koji se može koristiti za pokretanje selektivnih programa uzgoja, za koje je dokazano da značajno poboljšavaju performanse sektora akvakulture. Olakšavanje prijenosa osposobljavanja i tehnologije u različitim sektorima akvakulture može uvelike koristiti vrstama manje vrijednosti, povećavajući njihovu produktivnost i održivost.

Genom organizma može se modificirati umetanjem sintetičke DNK napravljene iz različitih izvora pomoću procesa poznatog kao tehnologija rekombinantne DNK. Implantacija genetskog fragmenta koji sadrži naš ciljni gen u postojeći genom prvi je korak u postupku. U ovoj tehnici restriksijski enzimi, vektori i stanice domaćina koriste se kao alati. Različiti enzimi uključeni su u procese rezanja, sinteze i vezivanja. Enzimi poput restriksijskih enzima dio su ove skupine. Za transport i uključivanje ciljnih gena korisni su vektori. Primjene tehnologije rekombinantne DNK uključuju kloniranje gena,



gensku terapiju i poljoprivredu. Slika 3 prikazuje različite korake uključene u tehnologiju rekombinantne DNK (Sankaran i Mandal, 2024).



Slika 3. Glavni koraci uključeni u tehnologiju rekombinantne DNK (Sankaran i Mandal, 2024.)

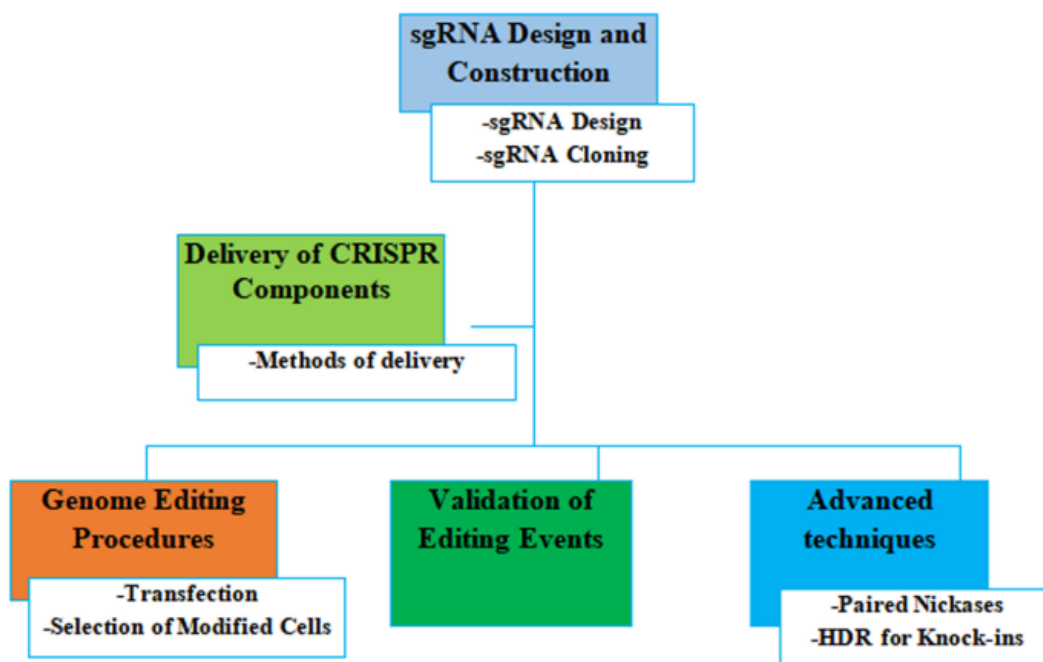
3.2. CRISPR u akvakulturi

CRISPR/Cas9 predstavlja revolucionarni alat u genetskom inženjeringu, koji omogućuje precizne i ciljane modifikacije riblje DNK kako bi se poboljšale osobine kao što su pigmentacija, rast, kvaliteta mišića i otpornost na bolesti. Ova tehnologija nadmašuje tradicionalne metode uzgoja nudeći jeftiniji, lakši i točniji pristup genetskom poboljšanju. Njegove primjene uključuju poboljšanje performansi rasta (npr. tjelesne težine, duljine i razvoja mišića), kvalitete mišića, otpornosti na bolesti i određivanja spola. Nadalje, CRISPR/Cas9 pruža obećavajuća rješenja za povećanje otpornosti na bolesti ciljanjem imunološki povezanih gena i putova prepoznavanja patogena, smanjujući potrebu za antibioticima i kemijskim tretmanima. Ova tehnologija značajno je unaprijedila akvakulturu genetskom optimizacijom ključnih svojstava ribljih vrsta. Na primjer, istraživači su uspješno manipulirali zametnim stanicama u atlantskom lososu kako bi kontrolirali diferencijaciju reproduktivnih stanica, poboljšali učinkovitost pretvorbe hrane za rast žutog soma, postigli ciljane genske modifikacije u tilapiji i smanjili neželjene učinke izvan cilja (Zhu i sur., 2024.).

Slika 4 prikazuje metode CRISPR/Cas9 uključene u uređivanje gena. Enzim Cas9 i RNK vodič dva su glavna dijela sustava. Pojednostavljena varijanta antivirusnog obrambenog sustava CRISPR-Cas9 koja se nalazi u bakterijama služi kao osnova za sustav CRISPR-Cas9. In vivo uređivanje gena omogućeno je umetanjem sintetičke vodeće RNK (gRNA) kompleksirane s Cas9 nukleazom u stanicu, a zatim rezanjem genoma na određenom mjestu. Budući da omogućuje jednostavno, pristupačno i precizno uređivanje genoma in vivo, ova metoda je iznimno važna u biotehnologiji i medicini. Osim potencijalne korisnosti u upravljanju štetočinama i bolestima, ima i druge potencijalne primjene u razvoju novih poljoprivrednih proizvoda, genetski modificiranih organizama i farmaceutskih proizvoda. Osim toga, obećava u liječenju nasljednih poremećaja i poremećaja



uzrokovanih somatskim mutacijama, uključujući rak. Sustav CRISPR/Cas9 nudi jednostavnu metodu vođenu RNK za izazivanje ciljanih promjena na određenim mjestima. Neki fenotipi, uključujući boju očiju ili osjetljivost na bolesti, mogu biti izazvani ovim promjenama DNK. Sustav koristi molekule RNK dizajnirane da odgovaraju ciljnim sekvencama DNK u kombinaciji s enzimom nukleaze Cas9.



Slika 4. CRISPR/Cas9 uređivanje gena (Sankaran i Mandal, 2024.)

Iako CRISPR/Cas9 ima potencijal revolucionirati područje genetskog inženjeringa, nije bez ograničenja. Točnost uređivanja genoma značajna je briga, jer rezultira trajnim promjenama u genomu. Osim toga, njegova upotreba u genetskoj modifikaciji ljudske zametne linije vrlo je kontroverzna. Općenito, korištenje uređivanja gena CRISPR/Cas9 ima kapacitet revolucionirati područja biotehnologije i medicine. Međutim, ključno je vježbanje razboritosti i promišljanje etičkih posljedica povezanih s njegovom primjenom (Sankaran i Mandal, 2024.).

3.2.1. Otpornost na bolesti

Otpornost na bolesti kritična je osobina u akvakulturi, koja odražava sposobnost vrste da izdrži infekcije, lošu kvalitetu vode i promjene u okolišu. Uređivanje genoma posredovano CRISPR/Cas9 pojavilo se kao moćna metoda za poboljšanje ove otpornosti. Integracijom antimikrobnih peptidnih gena (AMG) u genome riba, CRISPR/Cas9 smanjuje kolonizaciju bakterija, povećava preživljavanje nakon infekcije i mijenja ekspresiju gena povezanih s imunološkim sustavom. Ovo precizno uređivanje dovelo je do značajnog napretka, kao što je povećanje otpornosti na infektivnu nekrozu gušterače (IPN) i bakterijsku hladnovodnu bolest kod lososa i ciljanje gena JAM-A u amuru kako bi se blokirao ulazak virusa, dajući imunitet na reovirus amura (GCRV).

Kod tilapije, CRISPR/Cas9 je uredio gene povezane s imunološkim odgovorima, poboljšavajući otpornost na bakterijske patogene kao što su *Streptococcus agalactiae* i *Aeromonas hydrophila*. Slično tome, kod soma, ova tehnologija je ciljala imunološke regulacijske gene, povećavajući stopu preživljavanja nakon izlaganja patogenu. Ovaj napredak nadopunjen je tehnikama uvođenja stranih



gena, poboljšavajući otpornost na bolesti uz povećanje rasta i nutritivne vrijednosti kod vrsta poput tilapije i soma (Zhu i sur., 2024.).

3.2.2. Rast ribe i kvaliteta mišića

CRISPR/Cas9 bio je ključan u poboljšanju stope rasta i kvalitete mišića u svim vrstama akvakulture, uključujući nilsku tilapiju, kanalskog soma, običnog šarana i kalifornijsku pastrvu. Ciljajući gene povezane s hormonom rasta kao što je *miostatin* (*mstn*), koji inhibira rast mišića, istraživači su postigli značajna poboljšanja u tjelesnoj masi i razvoju mišića. Na primjer, kanalski som s poremećenim *mstn* genima pokazao je povećanje tjelesne težine od 29,7%, dok su slične modifikacije kod *Paralichthys olivaceus* i orade povećale mišićnu masu i optimizirale komercijalnu veličinu ribe.

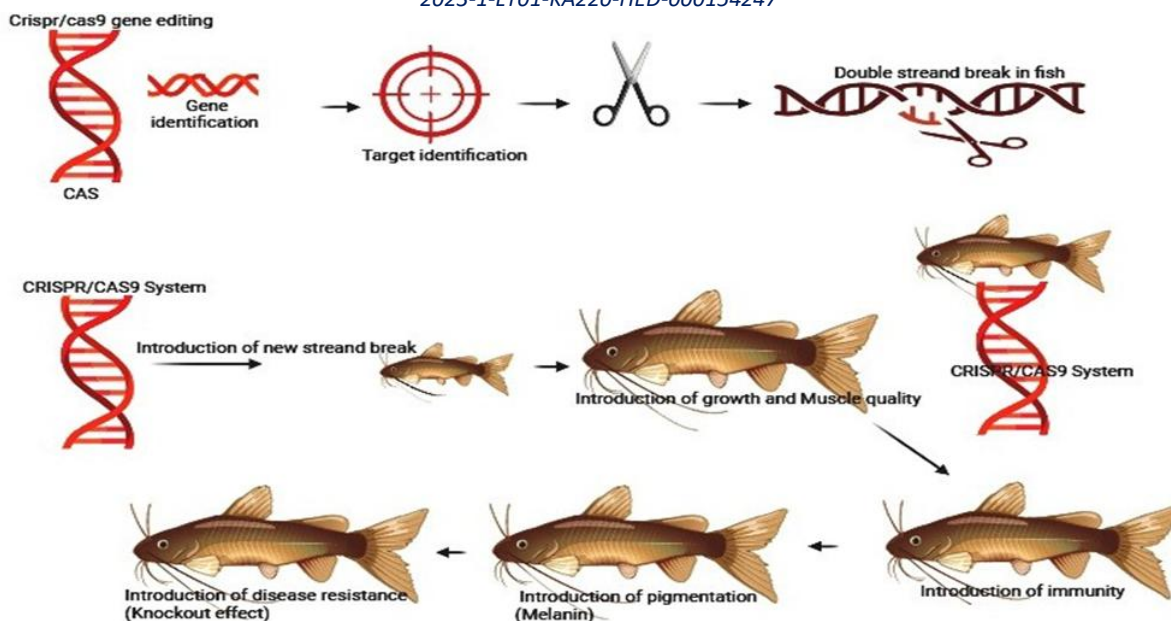
Osim rasta, CRISPR/Cas9 omogućuje proučavanje razvojnih procesa i modela ljudskih bolesti pomoću zebrice, široko korištenog organizma za genetska istraživanja. Transgene tehnike dodatno su unaprijedile uzgoj ribe prekomjernom ekspresijom gena hormona rasta u vrstama poput atlantskog lososa, postižući brzi rast i veće prinose kako bi se zadovoljila globalna potražnja za proteinima. Ove genetske modifikacije, u kombinaciji s optimiziranom prehranom i selektivnim uzgojem, poboljšavaju teksturu mišića i ukupnu učinkovitost akvakulture (Zhu i sur., 2024.).

3.2.3. Efekti izvan cilja u CRISPR/Cas9

Iako CRISPR/Cas9 nudi neusporedivu preciznost, nepoželjni efekti ostaju zabrinjavajući. Ove nenamjerne izmjene mogu utjecati na regije genoma koje nisu ciljane, potencijalno uzrokujući štetne učinke. Nedavni napredak, uključujući varijante Cas9 visoke vjernosti (npr. SpCas9-HF1, eSpCas9), značajno je smanjio aktivnost izvan cilja. Poboljšani dizajn vodilice RNA (gRNA) i algoritmi kao što je CRISPR-DO imaju poboljšanu specifičnost. Osim toga, novi alati poput baznih i primarnih uređivača omogućuju precizne modifikacije genoma bez izazivanja prekida dvostrukog lanca, minimizirajući mutacije izvan cilja. Napredni sustavi isporuke, kao što su nanočestice i virusni vektori, dodatno povećavaju točnost u aplikacijama za uređivanje gena.

Mnoge riblje vrste u akvakulturi imale su koristi od ovog napretka. Uređivanje visoke vjernosti omogućilo je istraživačima da poboljšaju rast, otpornost na bolesti i druge osobine uz održavanje genomskog integriteta.

Mehanizam koji koristi CRISPR/Cas9 u nokaut genima kod različitih vrsta riba prikazan je na slici 5.



Slika 5. Koraci primjene CRISPR/Cas9 u akvakulturi (Prvo, specifična gRNA je dizajnirana da odgovara ciljnoj sekvenci gena. Zatim se protein Cas9 veže za ciljnu DNK, uzrokujući prekid dvolanča. Konačno, prekid je popravljen) (Zhu i sur., 2024.)

3.2.4. Određivanje spola

Određivanje spola kod riba uključuje genetske, okolišne i epigenetske čimbenike, što ga čini složenim, ali vitalnim područjem proučavanja u akvakulturi. CRISPR/Cas9 je osvijetlio mehanizme spolne diferencijacije preciznim ciljanjem relevantnih gena. Na primjer, uređivanje gena *amh* u nilskoj tilapiji rezultiralo je fenotipskim ženjkama od genetskih mužjaka, pokazujući ulogu gena u određivanju muškog spola. Slične studije na zebrici istraživale su gene kao što su *dmrt1* i *sox9a*, otkrivajući poligenu prirodu određivanja spola kod ove vrste. Osim toga, CRISPR/Cas9 pregledi u cijelom genomu identificirali su glavne regulatore kao što je *gen sdY* u kalifornijskoj pastrvi, unaprjeđujući naše razumijevanje spolne diferencijacije.

3.2.5. Učinci korištenja CRISPR/Cas9 u uređivanju gena na različitim vrstama riba

CRISPR/Cas9 bavi se izazovima kao što su izbijanje bolesti, slabe stope rasta i degradacija okoliša u akvakulturi. Njegove se primjene proširuju na kontrolu invazivnih vrsta, inženjering mikroorganizama za sanaciju okoliša i stvaranje genetski modificirane ribe za održivu proizvodnju. Uređivanje genoma nudi rješenja za poboljšanje osobina riba uz ublažavanje ekološkog otiska akvakulture. Na primjer, transgene ribe s poboljšanom učinkovitošću pretvorbe hrane smanjuju upotrebu resursa, podržavajući ekološki prihvatljive prakse.

Omogućavanjem preciznih genetskih modifikacija, CRISPR/Cas9 transformirao je akvakulturu, utirući put održivim i učinkovitim praksama uzgoja ribe. Kontinuirani napredak u tehnikama uređivanja, etičkim razmatranjima i upravljanju okolišem dodatno će optimizirati njegovu primjenu u industriji. Tablica 1 daje sažetak svojstava koja su najčešće ciljana za uređivanje genoma u ribljnoj akvakulturi (Blix i sur., 2021.).

Tablica 1. Učinci CRISPR/Cas9 na biološke i ekološke aspekte ribljih vrsta



Primjenjiva polja	Utjecaje
Otpornost na bolesti	Koristi se za smanjenje virusne infekcije virusom hemoragijske septikemije (VHSV) stanica prirodnog embrija <i>Paralichthys olivaceus</i> (HINAE).
	Omogućuje uređivanje gena kod ribljih vrsta kao što su losos, tilapija i škampi kako bi se povećala njihova otpornost na bolesti.
	Pomaže u deleciji gena <i>JAM-A</i> u stanicama amura, što značajno povećava otpornost na infekciju reovirusom amura (GCRV).
	Pomaže u poboljšanju linija ribljih stanica za odgovor domaćina i genetsku otpornost na zarazne bolesti, koristeći atlantskog lososa i kalifornijsku pastrvu kao modelne sustave u akvakulturi.
Prilagodba okolišu	Pomaže u uređivanju gena u ribljim vrstama, kao što je uzgojeni losos, kako bi se prilagodili promjenjivom okruženju
Poboljšane stope rasta i mišići	Povećava rast mišića izbacivanjem gena receptora melanokortina (<i>mc4r</i>) i eksperimentalno je isproban na kanalskom somu i ribi medaka.
	Poboljšao je stope rasta i povećao mišićnu masu kanalskog soma modificirajući gen miostatina u embrijima kanalskog soma.
	Pomaže u povećanju mišićne mase tupe njuške zbog poremećaja <i>mstna</i>

CRISPR/Cas9 tehnologija uređivanja gena revolucionirala je akvakulturu omogućavajući precizne genetske modifikacije za poboljšanje svojstava kao što su otpornost na bolesti, rast i održivost. Ovaj alat također olakšava genske pogone, povećavajući stopu nasljeđivanja modificiranih gena na gotovo 100%, ubrzavajući širenje poželjnih osobina unutar populacije.

Li i sur., 2021. koristili su CRISPR/Cas9 za stvaranje sterilnih, potpuno muških populacija nilske tilapije, što je rezultiralo bržim stopama rasta i smanjenim ekološkim rizicima od odbjegle uzgojene ribe. Slično tome, Wargelius i suradnici poboljšali su otpornost na bolesti atlantskog lososa modificirajući gene bitne za virusnu infekciju, rješavajući značajne gubitke u akvakulturi uzrokovane patogenima poput IPNV i SAV.

Druge studije iskoristile su CRISPR/Cas9 za povećanje otpornosti na bolesti šarana, tilapije i soma ciljanjem imunološki povezanih gena ili putova prepoznavanja patogena. Uređivanje gena povezano s rastom također je dalo značajne uspjehe, kao što *su nokauti miostatina* kod običnog šarana, kanalskog soma i orade, što je dovelo do povećane veličine tijela i stope rasta.

Primjene CRISPR/Cas9 protežu se izvan proizvodnih svojstava, omogućujući stvaranje novih fenotipova. Primjeri uključuju albino nilsku tilapiju i modificirane pacifičke kamenice s pojačanim rastom. Svestranost tehnologije obuhvaća i vrste kao što su škampi, što dodatno pokazuje njezin transformativni potencijal u akvakulturi (tablica 2.).

Tablica 2. Primjena CRISPR/Cas9 u različitim vrstama riba i njihovi utjecaji
(Zhu i sur., 2024.)

Vrste riba	Tehnološki utjecaji
<i>Nilska tilapija</i>	Koristi se za proizvodnju sterilnih populacija nilske tilapije, smanjujući rizik od štete za okoliš od odbjegle ribe.
<i>Atlantski losos</i>	Pomaže u uređivanju gena kako bi se stvorile vrste koje su vrlo otporne na virusne infekcije, npr. losos
<i>Zebra</i>	Omogućuje znanstvenicima proučavanje mutacija i genetskih varijanti kod zebrice. Može se koristiti za uspješnu integraciju kompozitnih oznaka u embrije zebrice, omogućujući precizno označavanje i vizualizaciju staničnih struktura ili proteina. To nudi potencijal za proučavanje dinamike proteina, ekspresije gena i drugih bioloških procesa u ovom modelnom organizmu.



<i>Kalifornijska pastrva</i>	Pokazalo se da smanjuje ekspresiju gena <i>igfbp-2b</i> kod kalifornijske pastrve, utječući na rast i razvoj, ali njegov utjecaj na ukupnu izvedbu i endokrini sustav ostaje nejasan.
<i>Atlantski losos i kalifornijska pastrva</i>	Korišten je za ciljanje jedinstvenih gena povezanih s rastom i imunitetom u stanicama atlantskog lososa, kalifornijske pastrve i coho lososa.
<i>Oryzias latipes</i>	Ima potencijal povećati rast mišića i tjelesnu težinu kod uzgojenih vrsta riba kao što je medaka. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio njegov utjecaj na prinos proizvodnje i zdravlje riba.
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Može se koristiti za ometanje gena miostatina kod <i>Paralichthys olivaceus</i> potencijalno povećavajući tjelesnu težinu i mišićno tkivo, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razumjeli njegovi učinci na učinkovitost proizvodnje i zdravlje riba
<i>Kanalski som</i>	Korišten je za modificiranje gena miostatina u kanalskom somu kako bi se poboljšao rast i kvaliteta mišića, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjeli njegovi učinci.

4. Tehnologije krioprezervacije i potpomognute oplodnje

4.1. Akvakultura i krioprezervacija

Na uzgoj ribe utječu različiti čimbenici, a čak i najiskusniji operateri mrijestilišta često se susreću s djelomičnim ili potpunim neuspjesima u procesu uzgoja. Da bi se postigla željena količina sjemeni, inducirani uzgoj naširoko se smatra učinkovitom metodom. Ovaj pristup olakšava sazrijevanje i mrijest riba u nepovoljnim uvjetima, kao što su neadekvatne kiše ili ekstremni klimatski scenariji. Međutim, opetovani uzgojni naponi mogu uzeti značajan danak na zdravlje legla unutar njihovog ograničenog životnog vijeka. Zamjena legla izazovna je zbog logističkih i fizioloških problema povezanih s njihovim transportom. Posljedično, prijevoz spolnih stanica pojavio se kao obećavajuća alternativa, nudeći prednosti slične onima uočenim u stočarstvu.

Integracija biotehnoških alata u programe uzgoja ribe ključna je za osiguravanje dosljedne i održive proizvodnje sjemeni. Krioprezervacija predstavlja održivo rješenje za proizvodnju visokokvalitetnog sjemeni i genetski superiornih vrsta ribe. Prepoznajući njegov potencijal, Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) identificirala je krioprezervaciju kao ključnu strategiju za očuvanje genetskih resursa riba (Betsy i sur., 2022.).

Krioprezervacija se odnosi na očuvanje bioloških uzoraka na ekstremno niskim temperaturama, učinkovito zaustavljanje metaboličkih aktivnosti i očuvanje strukturnog i funkcionalnog integriteta na neodređeno vrijeme. Ova tehnologija postala je kamen temeljac reproduktivne biologije, nudeći ključne prednosti za stočarstvo i akvakulturu. Održavanjem temperature ispod -130°C , metaboličke aktivnosti potpuno prestaju, omogućujući biološkim uzorcima, kao što su stanice, tkiva, pa čak i cijeli organizmi, da ostanu održivi nakon odmrzavanja. Krioprezervacija ima posebnu važnost za očuvanje vrijednog genetskog materijala, poboljšanje programa uzgoja i podršku naporima za očuvanje biološke raznolikosti (Fletcher i Rise, 2012).

4.2. Osnovni principi stanične krioprezervacije

4.2.1. Mehanizmi očuvanja

Očuvanje omogućuje očuvanje spolnih stanica tijekom duljeg razdoblja, često u trajanju od nekoliko godina, bez značajnog utjecaja na njihovu sposobnost gnojide. Snižavanjem temperature na približno -196°C svi biološki i biokemijski procesi se zaustavljaju sprječavajući procese koji dovode



do stanične smrti i razgradnje DNK. Ovo predstavlja moćan alat za potporu dugoročnoj održivosti akvakulture i očuvanju biološke raznolikosti.

Međutim, stvaranje leda u biološkim sustavima predstavlja značajan izazov jer može dovesti do mehaničkih oštećenja i osmotske neravnoteže. Kontrolirani procesi hlađenja osiguravaju da se led stvara izvanstanično, stvarajući tako gradijent koncentracije koji olakšava istjecanje vode iz stanica. Ovaj proces sprječava smrtonosno stvaranje leda unutar stanice. Napredak u krioprotektivnim sredstvima (CPA) bio je ključan u ublažavanju ovih oštećenja, omogućujući uspješno očuvanje različitih tipova stanica, tkiva i malih bioloških struktura. Usavršavanjem međudjelovanja između brzina hlađenja, koncentracija CPA i karakteristika specifičnih za stanicu, istraživači su poboljšali ishode krioprezervacije.

4.2.2. Krioprotektivna sredstva

Krioprotektivna sredstva igraju ključnu ulogu u smanjenju stvaranja leda unutar stanice i održavanju integriteta proteina i membrane tijekom zamrzavanja i odmrzavanja. Ovi agensi spadaju u dvije kategorije: propusni i nepropusni. Propusni CPA, kao što su DMSO, glicerol i metanol, prodiru u staničnu membranu kako bi uravnotežili unutarstanične i izvanstanične osmotske tlakove. Nepropusni CPA, uključujući šećere i određene proteine, prvenstveno djeluju izvanstanično kako bi promijenili točku leđišta otopine i pružili dodatnu zaštitu. Unatoč njihovim prednostima, CPA se moraju koristiti oprezno, jer mogu izazvati toksičnost, osmotski stres i kromosomske abnormalnosti ako se nepravilno primjenjuju. Balansiranje zaštitnih učinaka i potencijalnih štetnih ishoda kritično je područje tekućih istraživanja.

4.2.3. Protokoli hlađenja i odmrzavanja

Uspjeh krioprezervacije u velikoj mjeri ovisi o preciznoj kontroli protokola hlađenja i odmrzavanja. Kontrolirane brzine smrzavanja, obično u rasponu od $-40\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ do sporijih brzina, ključne su za minimiziranje stvaranja kristala leda. Specijaliziran bio-zamrzivači i metode dušikove pare su široko rasprostranjene za postizanje ovih kontroliranih uvjeta. Nasuprot tome, odmrzavanje mora biti brzo kako bi se spriječila rekristalizacija leda, što može ozbiljno oštetiti stanične strukture. tehnologije u nastajanju, uključujući programibilne uređaje za zamrzavanje i napredne tehnike odmrzavanja, nastojati standardizirati i optimizirati ove procese za različite biološke materijale, čime se poboljšavaju stope preživljavanja i funkcionalni oporavak (Fletcher i Rise, 2012).

4.3. Krioprezervacija spolnih stanica

4.3.1. Krioprezervacija sperme

Krioprezervacija sperme predstavlja jednu od najuspješnijih primjena kriobiologije, s dobro uspostavljenim protokolima u stočarstvu i proširenom primjenom u akvakulturi. Međutim, riblji spermatozoidi pokazuju značajne razlike u odnosu na spermu sisavaca, što zahtijeva jedinstvene pristupe. Ključne karakteristike sperme riba uključuju njihovu nepokretnost u sjemenoj plazmi, aktivaciju pokretljivosti nakon izlaganja aktivirajućim otopinama, visoku osjetljivost na osmotske promjene i relativno nisku proizvodnju ATP-a. Ove jedinstvene osobine naglašavaju potrebu za



prilagođenim strategijama krioprezervacije kako bi se osigurala održivost i funkcionalnost nakon odmrzavanja.

Razvoj učinkovitih protokola za krioprezervaciju sperme riba uključuje nekoliko kritičnih koraka: Prikupljanje sperme: Dobivanje visokokvalitetne sperme bez zagađivača je neophodno. Obično se koriste tehnike kao što su masaža trbuha, aspiracija ili izravno vađenje iz testisa, ovisno o vrsti. Mora se paziti da se izbjegne kontaminacija tvarima poput urina, koje mogu prerano aktivirati pokretljivost.

Analiza kvalitete: Procjena kvalitete sperme ključna je za odabir uzoraka prikladnih za zamrzavanje. Procjenjuju se parametri kao što su pokretljivost, održivost, pH i osmolalnost, često koristeći napredne računalne sustave kako bi se osigurala točnost.

Formulacija ekstendera: Ekstenderi su puferirane otopine dizajnirane da spriječe preranu aktivaciju pokretljivosti i osiguraju optimalno okruženje za zamrzavanje. Uobičajene komponente uključuju glukozu, žumanjak, antioksidante i CPA poput DMSO-a ili glicerola. Izbor ekstendera razlikuje se ovisno o vrsti i specifičnim zahtjevima.

Zamrzavanje i odmrzavanje: Sperma se obično ubacuje u francuske slamke ili kriovijale i zamrzava kontroliranim brzinama prije nego što se pohrani u tekući dušik (-196°C). Odmrzavanje se mora brzo provesti u vodenoj kupelji kako bi se osigurala maksimalna održivost. Na Slici 6 prikazan je postupak zamrzavanja sperme.



Slika 6. Postupak zamrzavanja sperme: (A) ekstrakcija sperme pastrve kaulacijom, (B) razrjeđivanje u nastavku za krioprotekciju, (C) punjenje francuskim slamkama od 0,5 cc (umetnute s različitim slamkama, kriovijalcima i PVA prahom za brtvljenje slame), (D) zamrzavanje preko plutajućeg uređaja u kutiji od stiropora koja sadrži N₂l, (E) skladištenje u spremniku N₂l, (F) skidanje ženki, (G) odmrzavanje sperme u vodenoj kupelji, i (H–J) oplodnja (Fletcher i Rise, 2012.)



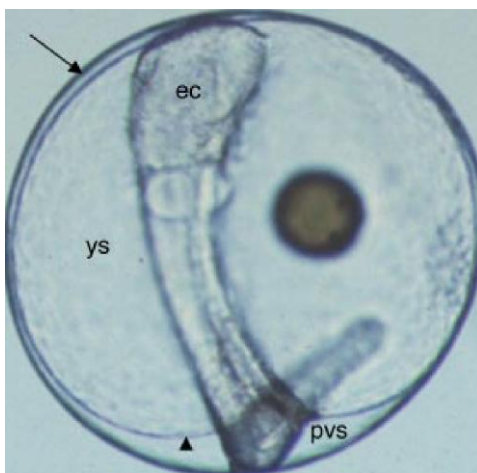
4.3.2. Krioprezervacija jajnih stanica

Za razliku od sperme, jajne stanice predstavljaju značajne izazove za krioprezervaciju. Njihova velika veličina, složena struktura i ograničena propusnost za CPA čine ih vrlo osjetljivima na krioštećenje. Problemi kao što su osjetljivost na hlađenje, stvaranje leda unutar stanice i toksičnost CPA posebno su izraženi. Štoviše, prisutnost višestrukih membranskih slojeva i visok sadržaj lipida dodatno otežavaju proces konzerviranja.

Nedavna istraživanja usredotočila su se na očuvanje jajnih stanica u ranim razvojnim fazama, gdje njihova strukturna jednostavnost može smanjiti osjetljivost na krioštećenje. Strategije uključuju postupno uklanjanje CPA kako bi se smanjila toksičnost, studije otpornosti na hlađenje i primjenu tehnika vitifikacije. Vitifikacija, koja uključuje ultrabrzo zamrzavanje s visokim koncentracijama CPA, nudi obećavajuću alternativu uklanjanjem stvaranja kristala leda. Međutim, i dalje postoje izazovi u postizanju ujednačene distribucije CPA i minimiziranju toksičnosti.

4.4. Krioprezervacija embrija

Krioprezervacija ribljih embrija, čiji je cilj očuvanje genetskog materijala majke i oca, ima znatan potencijal za poboljšanje reproduktivnog upravljanja akvakulturom. Unatoč obećavajućim rezultatima uspješna krioprezervacija ribljih embrija ostaje izazov zbog biološke složenosti embrija, poput njihove velike veličine, kompleksne strukture i ograničene propusnosti za krioprotektivna sredstva (CPA). Ovi čimbenici, u kombinaciji s prisutnošću barijera poput sincicijskog sloja žumanjka (YSL), otežava učinkovitu distribuciju CPA i vode unutar embrija (lika 7, Hagedorn i sur., 1997).



Slika 7. Embrij romba u stadiju repnog pupoljka koji pokazuje različite ovojnice i odjeljke: horion (strelica), sincicijski sloj žumanjka (vrh strelice), žumanjčana vrećica (ys), perivitelinski prostor (pvs) i odjeljak embrija (ec) (Hagedorn i sur., 1997)

Jedna od glavnih prepreka je visok sadržaj vode u embrijima, što može uzrokovati stvaranja leda i oštećenja stanica tijekom smrzavanja i odmrzavanja. Embriji u ranoj fazi, koji teoretski imaju jednostavniju strukturu pogodnu za očuvanje, vrlo su osjetljivi na hlađenje i toksičnost CPA, što dodatno otežava krioprezervaciju.



Studije o osjetljivosti na hlađenje u ribljim embrijima pokazale su da su rane razvojne faze osjetljivije na niske temperature nego kasnije faze. Strategije za ublažavanje ozljeda od hlađenja uključuju modificiranje strukture embrija i korištenje zaštitnih tvari kao što su proteini protiv smrzavanja (AFP). Ovi su pristupi pokazali potencijal za povećanje otpornosti na niske temperature, ali još nisu postigli dosljedan uspjeh.

Upotreba vitrifikacije, tehnike koja eliminira stvaranje leda ultrabrzim smrzavanjem, predložena je kao način za prevladavanje ovih izazova. Međutim, vitrifikacija zahtijeva visoke koncentracije CPA, koji mogu biti toksični i teško ih je ravnomjerno rasporediti unutar embrija zbog ograničene propusnosti. Istražuju se različite eksperimentalne tehnike, kao što su povećanje propusnosti embrija i poboljšanje sustava isporuke CPA-a, kako bi se riješila ta ograničenja.

Nedavni napredak uključuje metode za zaobilazanje barijera poput YSL-a i poboljšanje penetracije CPA. Tehnike poput mikroinjekcije CPA-a ili genetskog inženjeringa za poboljšanje propusnosti embrija pokazale su se obećavajućim. Osim toga, upotreba prirodnih proteina protiv smrzavanja pokazala je potencijal u smanjenju stvaranja kristala leda i ublažavanju oštećenja uzrokovanih smrzavanjem. Iako su ove metode još uvijek u eksperimentalnoj fazi, one nude vrijedan uvid u budućnost krioprezervacije embrija.

Prevladavanje izazova krioprezervacije ribljih embrija zahtijevat će interdisciplinarnu suradnju i tehnološke inovacije. Naponi su usmjereni na poboljšanje krioprotekcije na staničnoj razini i poboljšanje tehnika za isporuku CPA. Obećavajući smjerovi uključuju korištenje naprednih laserskih tehnologija za stvaranje privremenih pora u embrijima i razvoj genetski modificiranih sojeva s povećanom otpornošću na oštećenja smrzavanjem.

Uz kontinuirano istraživanje, krioprezervacija ribljih embrija mogla bi postati pouzdan alat za akvakulturu, podržavajući očuvanje genetskih resursa i promičući održive prakse u uzgoju ribe.

4.5. Krioprezervacija embrija

Tehnologija krioprezervacije razvijena je za mnoge vrste riba (Betsy i sur., 2022.):

- Ova se tehnologija može koristiti za očuvanje najbolje dobne skupine koja se može koristiti u bilo kojem trenutku u budućnosti.
- Također može eliminirati problem inbreedinga jer se kriokonzervirani spermatozoidi mogu lako razmjenjivati između mrijestilišta.
- Pomoću ove tehnologije spermatozoidi mogu biti dostupni u bilo koje doba godine.
- Omogućuje uzgoj izvan sezone.
- Sinkronizira dostupnost spolnih stanica oba spola što dovodi do ekonomije sperme.
- Pojednostavljuje upravljanje leglom na farmama.
- Pomaže u proizvodnji održivog i snažnog potomstva hibridizacijom unutar vrste.
- Prevladava poteškoće koje nastaju zbog kratkotrajne održivosti spolnih stanica.
- Omogućuje genetsko očuvanje željenih linija.
- Omogućuje križanje u različito doba godine.
- Pomaže u skladištenju germplazme za programe genetske selekcije ili očuvanje vrsta.
- Kriokonzervirani spermatozoidi mogu pomoći u programima hibridizacije i istraživanjima genetskog inženjeringa na ribama.
- To dovodi do mnogih drugih puteva kao što je kriobankiranje održivih spolnih stanica kao u slučaju životinjske proizvodnje i razvoja banke gena i genetske manipulacije kod riba.



Krioprezervacija predstavlja transformativni alat u biotehnologiji akvakulture, nudeći značajne prednosti za genetsko očuvanje, programe uzgoja i očuvanje biološke raznolikosti. Iako izazovi ostaju, posebno u očuvanju embrija i jajnih stanica, stalni napredak u krioprotektivnim metodama, genetskim alatima i interdisciplinarnim istraživanjima obećava prevladavanje ovih prepreka. Budući razvoj vjerojatno će proširiti opseg i učinkovitost krioprezervacije, osiguravajući njezinu širu primjenu u akvakulturi i šire. Kroz kontinuirane inovacije, krioprezervacija je spremna igrati integralnu ulogu u podršci održivom rastu akvakulture i očuvanju vodene biološke raznolikosti (Fletcher & Rise, 2012).

5. Etička, ekološka i regulatorna razmatranja u biotehnologiji akvakulture

5.1. Etička pitanja u biotehnologiji akvakulture

5.1.1. Dobrobiti životinja u genetskoj modifikaciji

Etičke implikacije genetske modifikacije u akvakulturi su duboke, posebno u pogledu dobrobiti životinja. Genetske intervencije, kao što su transgeneza i uređivanje gena, često imaju za cilj poboljšati proizvodne osobine kao što su stope rasta, otpornost na bolesti ili tolerancija na okoliš. Međutim, ove modifikacije mogu nenamjerno uzrokovati fiziološki stres ili zdravstvene komplikacije. Na primjer, ubrzani rast transgenih riba može dovesti do deformiteta kostura, smanjene imunološke funkcije ili promijenjene brzine metabolizma. Kritičari tvrde da davanje prioriteta produktivnosti nad dobrobiti može ugroziti etički tretman ovih organizama, postavljajući pitanja o ravnoteži između inovacija i humanih praksi.

Ograničena priroda sustava akvakulture dodatno pojačava ovu zabrinutost. Riba koje se uzgajaju u takvim okruženjima često su izložene velikoj gustoći populacije, što dovodi do stresa, osjetljivosti na bolesti i promjena u ponašanju. Etička razmatranja proširuju se na to jesu li genetski modificirane ribe više ili manje prikladne za razvoj u takvim uvjetima u usporedbi sa onima u prirodi. Razvoj mjernih podataka o dobrobiti posebno prilagođenih genetski izmijenjenim vodenim vrstama ključan je kako bi se osiguralo da njihova kvaliteta života ne bude neopravdano ugrožena.

5.1.2. Ekološki integritet i biološka raznolikost

Osim dobrobiti pojedinca, etička pitanja obuhvaćaju šire ekološke učinke biotehnoloških intervencija. Uvođenje genetski modificiranih ili selektivno uzgojenih vrsta u sustave akvakulture ili prirodna staništa predstavlja rizik za ekološki integritet. Na primjer, transgene ribe s povećanim stopama rasta mogu nadmašiti autohtone vrste za resurse, narušavajući lokalne ekosustave i potencijalno dovodeći do smanjenja ili izumiranja prirodnih populacija. Ti problemi naglašavaju moralnu odgovornost osiguravanja da biotehnološke primjene ne ugrožavaju biološku raznolikost i otpornost vodenih ekosustava.

Etička rasprava također se dotiče ljudskog upravljanja biološkom raznolikošću. Iako biotehnologija može pomoći u naporima za očuvanje, kao što je krioprezervacija genetskog materijala ugroženih vrsta, ona također postavlja pitanja o pravu čovječanstva da mijenja genetske kodove u ekonomske ili ekološke svrhe. Postizanje ravnoteže između iskorištavanja biotehnologije za pozitivne ishode i očuvanja prirodnih evolucijskih procesa vodenih vrsta ostaje ključni etički izazov.



5.2. Regulatorni okviri

5.2.1. Globalni standardi i smjernice

Upravljanje biotehnološkim primjenama u akvakulturi složeno je područje koje se razvija. Međunarodne organizacije kao što su Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) i Konvencija o biološkoj raznolikosti (CBD) uspostavile su okvire za usmjeravanje sigurne i etičke uporabe biotehnologije. Ove smjernice naglašavaju načelo predostrožnosti, zagovarajući temeljite procjene rizika i praćenje prije odobrenja i puštanja genetski modificiranih organizama (GMO) u sustave akvakulture.

Jedan od ključnih aspekata globalnih standarda je usklađivanje propisa u svim zemljama kako bi se osigurala dosljednost u sigurnosnim mjerama i zaštiti okoliša. To je posebno važno s obzirom na prekograničnu prirodu vodenih ekosustava i potencijal bjegunaca da utječu na vode susjednih zemalja. Suradnja među zemljama putem ugovora i sporazuma ima ključnu ulogu u uspostavljanju jedinstvenih praksi i ublažavanju rizika

5.2.2. Nacionalni regulatorni pristupi

Na nacionalnoj razini, regulatorni okviri uvelike se razlikuju, odražavajući različite prioritete, tehnološke kapacitete i društvene stavove prema biotehnologiji. Neke zemlje, poput Sjedinjenih Država i Kanade, imaju robusne sustave za procjenu sigurnosti i učinkovitosti genetski modificiranih organizama, uključujući opsežne procese pregleda koji uključuju znanstvene, ekološke i javnozdravstvene procjene. S druge strane, drugim regijama možda neće imati sveobuhvatne regulatorne strukture, što dovodi do nedostataka u nadzoru i potencijalnih rizika.

Regulatorni pristupi često uključuju procese u više koraka, počevši od laboratorijskih ispitivanja i prolazeći kroz kontrolirana terenska ispitivanja prije potpune implementacije. Ovi procesi imaju za cilj procijeniti ekološke, ekonomske i društvene implikacije novih biotehnologija. Javno savjetovanje i transparentnost sve se više prepoznaju kao ključne sastavnice regulatornih okvira kojima se potiče povjerenje i osigurava da odluke odražavaju društvene vrijednosti.

5.2.3. Procjene sigurnosti i postupci odobravanja

Procjene sigurnosti ključne su za regulatorne okvire, pružajući znanstvenu osnovu za procjenu potencijalnih rizika biotehnoloških primjena. Te se procjene obično odnose na nekoliko ključnih područja:

Rizici za okoliš: Procjena vjerojatnosti bijega i potencijalnih ekoloških utjecaja GMO-a, uključujući natjecanje s autohtonim vrstama, hibridizaciju i modifikaciju staništa.

Rizici za ljudsko zdravlje: Osiguravanje da genetski modificirana riba namijenjena konzumaciji ne sadrži alergene, toksine ili neželjene genetske učinke koji bi mogli naštetiti potrošačima.

Praćenje ekosustava: Provedba programa praćenja nakon odobrenja za otkrivanje i ublažavanje nepredviđenih utjecaja, osiguravajući dugoročnu održivost.

Procesi odobravanja često uključuju koordinaciju između više agencija, uključujući tijela za zaštitu okoliša, poljoprivredu i javno zdravstvo. Rigorozne znanstvene procjene, u kombinaciji s javnim doprinosom, imaju za cilj uravnotežiti inovacije sa sigurnosnim i etičkim razmatranjima.

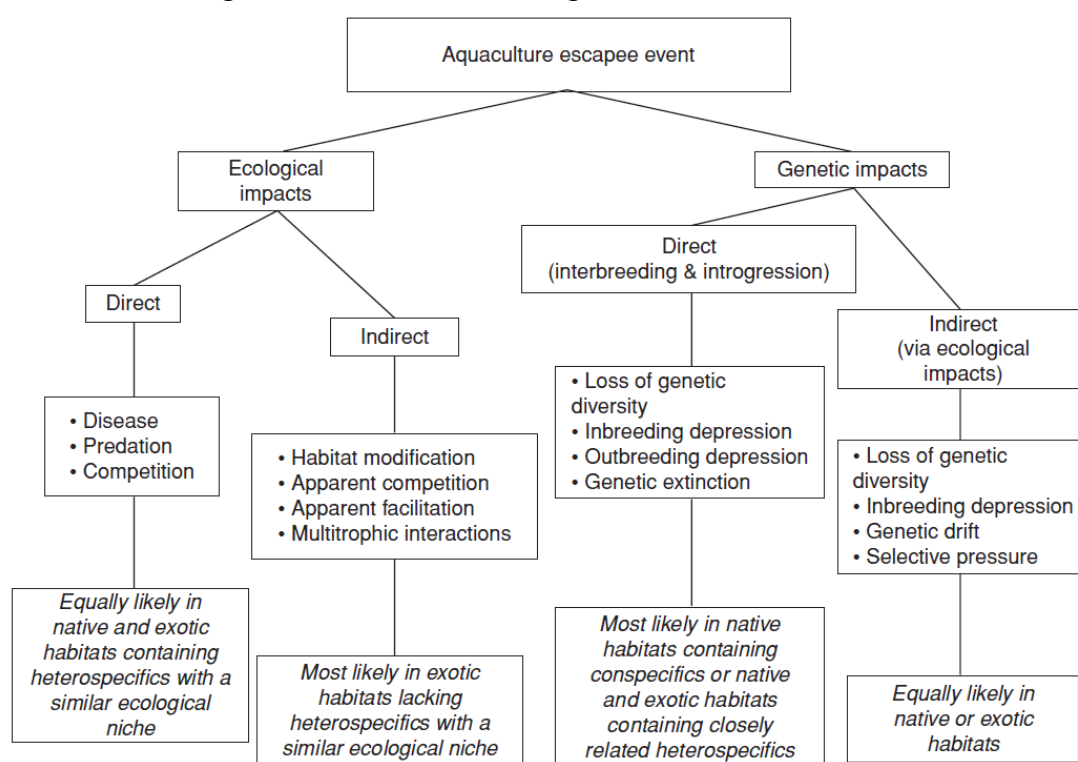


5.3. Utjecaji biotehnologije akvakulture na okoliš

5.3.1. Dinamika ekosustava i genetsko onečišćenje

Jedan od najznačajnijih ekoloških rizika biotehnologije akvakulture je genetsko zagađenje, gdje se geni genetski modificiranih ili selektivno uzgojenih vrsta prenose na prirodne populacije. To se može dogoditi križanjem, što dovodi do genetske homogenizacije i gubitka lokalno prilagođenih osobina kod prirodnih populacija. Dugoročne posljedice takve genetske introgresije uključuju smanjenu otpornost na promjene u okolišu i smanjenu biološku raznolikost.

Učinci selekcije pripitomljavanja na genetske i fenotipske karakteristike vrsta u akvakulturi dovode do različitih potencijalnih utjecaja na okoliš nakon ispuštanja u prirodu. Na slici 8 prikazani su mehanizmi odgovorni za navedene utjecaje unutar četiri kategorije: izravni ekološki učinci, neizravni ekološki učinci, izravni genetski učinci i neizravni genetski učinci.



Slika 8. Mogući utjecaj bjegunaca iz akvakulture na okoliš

Sustavi akvakulture posebno su osjetljivi na bijeg, gdje riba iz uzgoja ulazi u prirodne ekosustave. Ovi bjegunci mogu nadmašiti divlje populacije za resurse, uvesti bolesti i poremetiti dinamiku hranidbene mreže. Ublažavanje ovih rizika zahtijeva snažne strategije suzbijanja, kao što su fizičke barijere, i razvoj sterilnih genetski modificiranih riba kako bi se spriječilo razmnožavanje u prirodi.

5.3.2. Interakcije s prirodnim populacijama

Interakcije između uzgojenih i prirodnim populacija nadilaze genetske utjecaje. Transgene ribe s poboljšanim osobinama, kao što su brži rast ili veća otpornost na bolesti, mogu imati ekološke prednosti u odnosu na prirodne populacije. Ove prednosti mogu dovesti do promjena u odnosima grabežljivca i plijena, promijenjene dinamike natjecanja i promjena u korištenju staništa.



Istraživanje ponašanja i ekoloških uloga genetski modificiranih riba ključno je za predviđanje i upravljanje tim interakcijama. Dugoročne ekološke studije, u kombinaciji s prediktivnim modeliranjem, mogu pomoći u prepoznavanju potencijalnih rizika i usmjeravanju praksi upravljanja.

5.3.3. Dugoročna održivost

Osiguravanje dugoročne održivosti biotehnologije akvakulture zahtijeva holistički pristup koji uzima u obzir ekološku, ekonomsku i socijalnu dimenziju. To uključuje smanjenje uništavanja staništa, optimizaciju korištenja resursa i zaštitu prirodnih populacija. Napredak u biotehnologiji, kao što je razvoj ekološki prihvatljive hrane za uzgojne organizme i poboljšanje sustava gospodarenja otpadom, može doprinijeti održivijim praksama akvakulture.

Praćenje i prilagodljivo upravljanje ključne su komponente održive akvakulture. Kontinuiranom procjenom utjecaja biotehnoloških intervencija na okoliš i prilagođavanjem praksi u skladu s tim, dionici mogu uravnotežiti produktivnost s ekološkom odgovornošću

5.4. Balansiranje napretka i odgovornosti

Integracija biotehnologije u akvakulturu nudi goleme mogućnosti za rješavanje globalnih izazova kao što su sigurnost opskrbe hranom i očuvanje biološke raznolikosti. Međutim, ovaj napredak mora biti popraćen snažnom predanošću etičkim načelima, strogim regulatornim nadzorom i proaktivnim ekološkim upravljanjem. Poticanjem suradnje između znanstvenika, kreatora politika, dionika u industriji i javnosti, akvakultura se može razvijati na inovativan i održiv način.

Etička, ekološka i regulatorna razmatranja nisu prepreke koje treba prevladati, već ključni elementi odgovornog napretka biotehnologije akvakulture. Pažljivim planiranjem, transparentnim donošenjem odluka i kontinuiranim istraživanjima, sektor može ostvariti svoj puni potencijal uz očuvanje dobrobiti vodenih ekosustava i zajednica koje ovise o njima (Fletcher i Rise, 2012).

Sažetak

Globalno zatopljenje značajno je poremetilo cikluse razmnožavanja, stope rasta i opstanak vodenih vrsta. Porast temperature vode mijenja vrijeme mriješta i brzinu metabolizma, što dovodi do neusklađenosti s dostupnošću hrane te do neoptimalnih uvjeta za razvoj ličinki. Vrste poput atlantskog bakalara i europskog smuđa razmnožavaju se ranije, što rezultira smanjenim stopama preživljavanja njihovih potomaka. Osim toga, povišene temperature mogu smanjiti razinu kisika u vodi, stresirajući ličinke i utječući na razvoj mladunčadi. Iako se neke vrste genetski prilagođavaju kako bi se nosile s tim promjenama, brze promjene u okolišu često nadmašuju sposobnost populacija da se prilagode, što dovodi do dugoročnog smanjenja populacija.

Akvakultura je prihvatila biotehnologiju kako bi ublažila ove izazove i povećala otpornost uzgajanih vrsta. Programi selektivnog uzgoja usredotočeni su na osobine kao što su tolerancija na toplinu, otpornost na bolesti i učinkovitost rasta. Genomska selekcija ubrzava ovaj proces korištenjem genetskih markera za razmnožavanje poželjnih osobina. Na primjer, atlantski losos uzgajan je za podnošenje viših temperatura i hipoksičnih uvjeta, dok su genomske alati korišteni za razvoj sojeva kalifornijske pastrve i drugih vrsta otpornih na bolesti.



Tehnologija CRISPR/Cas9 pojavila se kao revolucionarni alat u akvakulturi, omogućujući precizne i ciljane modifikacije genoma riba. Ova metoda omogućuje poboljšanje ključnih osobina uključujući rast, kvalitetu mišića, otpornost na bolesti i prilagodbu okolišu. Na primjer, enetske modifikacije kod vrsta poput nilske tilapije i kanalskog soma dovele su do bržeg rasta i poboljšanog razvoja mišića ciljanjem gena miostatina (mstn). Slično tome, CRISPR/Cas9 je korišten za povećanje otpornosti na bolesti atlantskog lososa i amura putem uređivanja gena povezanih s imunitetom i putevima prepoznavanja patogena.

Osim poboljšanja individualnih osobina, CRISPR ima primjenu u određivanju spola i upravljanju populacijom. Tehnike poput stvaranja sterilnih populacija smanjuju ekološke rizike povezane s bijegom ribe iz uzgoja. Unatoč ovom napretku, tehnologija nije bez izazova. Učinci izvan cilja i etička zabrinutost oko uređivanja genoma, posebno u pogledu dobrobiti životinja i ekoloških rizika, zahtijevaju snažan regulatorni nadzor i daljnja istraživanja.

Krioprezervacija je još jedna ključna tehnologija koja omogućuje očuvanje genetskih resursa i poboljšava učinkovitost uzgoja. Čuvanjem spolnih stanica i embrija na ultra niskim temperaturama, ova tehnika podržava očuvanje biološke raznolikosti i programe uzgoja u svim godišnjim dobima i zemljopisnim područjima. Međutim, izazovi kao što su osjetljivost na hlađenje i toksičnost krioprotektivnih sredstava, posebno kod jajnih stanica i embrija, naglašavaju potrebu za stalnim istraživanjima kako bi se optimizirali protokoli i poboljšale stope uspjeha.

Integracija biotehnologije u akvakulturu otvara duboka etička i ekološka pitanja. Potencijal genetski modificiranih organizama (GMO) da pobjegnu u prirodne ekosustave i križaju se s prirodnim populacijama predstavlja rizik za genetski integritet i biološku raznolikost. Regulatorni okviri na nacionalnoj i međunarodnoj razini ključni su za rješavanje ovih problema, uz naglasak na procjeni rizika, praćenju i angažmanu javnosti. Etička razmatranja proširuju se i na dobrobit životinja, posebno u osiguravanju da biotehnološke intervencije ne ugrožavaju zdravlje i dobrobit uzgajanih vrsta.

Budućnost akvakulture ovisi o ravnoteži između tehnološkog napretka i održivosti. Inovacije poput CRISPR/Cas9 i genomske selekcije imaju ogroman potencijal za povećanje otpornosti i produktivnosti. Međutim, interdisciplinarna suradnja, učinkovito upravljanje i ekološka odgovornost ključni su za smanjenje negativnih utjecaja i osiguravanje dugoročne održivosti. Prioritiziranjem etičkih praksi i održivosti, akvakultura može imati ključnu ulogu u rješavanju globalnih izazova sigurnosti hrane te očuvanju vodene biološke raznolikosti.

Ovo poglavlje naglašava hitnost rješavanja međusobno povezanih izazova klimatskih promjena i održivosti akvakulture putem inovativnih i odgovornih biotehnoloških rješenja. Iskorištavanjem potencijala ovog napretka, akvakulturna industrija može doprinijeti globalnim naporima za očuvanje biološke raznolikosti, povećanje otpornosti na klimatske promjene i osiguranje sigurnosti hrane.

Reference

- Angilletta, M. J., et al. (2004). "Thermal Adaptation of Ectotherms." *Nature*.
- Chevin, L. M., et al. (2010). "Adaptation to Climate Change." *Ecology Letters*.
- Durant, J. M., et al. (2007). "Trophic Match-Mismatch and Climate Change." *Ecology*.
- Fischer, J. R., et al. (2014). "Evolutionary Responses of Aquatic Species to Climate Change." *Nature Climate Change*.
- Heath, M. R., et al. (2014). "Climate Change and Fish Growth." *Fish and Fisheries*.



- Jorgensen, C., et al. (2017). "Local Adaptation of Atlantic Cod to Thermal Variation." *Journal of Evolutionary Biology*.
- Lynch, M., et al. (2014). "Evolution in Changing Environments." *Trends in Ecology & Evolution*.
- O'Reilly, C. M., et al. (2008). "Impacts of Climate Change on Fish Populations." *Science*.
- Parmesan, C. (2006). "Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*.
- Pörtner, H. O., et al. (2014). "Oxygen Supply and Temperature in Aquatic Ecosystems." *Nature*.
- Tompkins, E. M., et al. (2017). "Effects of Warming on Fish Breeding Patterns." *Global Change Biology*.
- Walther, G. R., et al. (2002). "Ecological Responses to Recent Climate Change." *Nature*.
- Gjøen, H. M., et al. (2018). "Aquaculture breeding programs for climate resilience." *Aquaculture Reports*.
- Houston, R. D., et al. (2018). "Selective breeding for disease resistance in aquaculture species: challenges and progress." *Fisheries Research*.
- Huntingford, F. A., et al. (2020). "The potential of selective breeding for climate resilience in aquaculture species." *Aquaculture*.
- Liu, Y., et al. (2020). "Genomic selection for heat tolerance in rainbow trout: A practical approach." *Journal of Fish Biology*.
- Vázquez, R., et al. (2018). "Genomic selection in aquaculture for disease resistance." *Aquaculture International*.
- Yang, Z., Yu, Y., Tay, Y. X., & Yue, G. H. (2021). Genome editing and its applications in genetic improvement in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 00(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/raq.12591>
- Sankaran, G. B., & Mandal, A. (2024). Genetic improvements in aquaculture. *The Trout Journal of Atatürk University*, 2(1–2), 16–25. <https://doi.org/10.62425/tjau.1570599>
- Zhu, M., Sumana, S. L., Abdullateef, M. M., Falayi, O. C., Shui, Y., Zhang, C., Zhu, J., & Su, S. (2024). CRISPR/Cas9 technology for enhancing desirable traits of fish species in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9299. <https://doi.org/10.3390/ijms25179299>
- Blix, T. B., Dalmo, R. A., Wargelius, A., & Myhr, A. I. (2021). Genome editing on finfish: Current status and implications for sustainability. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2344–2363. [https://doi.org/\[CrossRef\]](https://doi.org/[CrossRef])
- Li, M., Dai, S., Liu, X., Xiao, H., & Wang, D. (2021). A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tilapia. *Journal of Hydrobiology*, 848, 3865–3881. [https://doi.org/\[CrossRef\]](https://doi.org/[CrossRef])
- Wargelius, A., Leininger, S., Skaftnesmo, K. O., Kleppe, L., Andersson, E., Taranger, G. L., Schulz, R. W., & Edvardsen, R. B. (2016). Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 6, 21284. [https://doi.org/\[CrossRef\]](https://doi.org/[CrossRef]) [PubMed]
- Betsy, C. J., C, S., & Sampath Kumar, J. S. (2022). Cryopreservation and its application in aquaculture. In *Cryopreservation and Its Application in Aquaculture*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99629>
- Fletcher, G. L., & Rise, M. L. (Eds.). (2012). *Aquaculture biotechnology*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Hagedorn, M., Hsu, E., Kleinhans, F. W., & Wildt, D. E. (1997). New approaches for studying the permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation. *Cryobiology*, 34(4), 335–347.