



Funded by
the European Union



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCa]”
2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

Модуль 3. Глобальне потепління та розведення, біотехнології в аквакультурі

Проф., д.т.н. Галина Крусір

Проф. , д.т.н. Марина Мардар

Доц., к.т.н. Ольга Сагдєєва

Одеський національний технологічний університет

Вступ

Водні екосистеми, необхідні для глобального біорізноманіття та засобів до існування людей, зазнають безпрецедентних змін через глобальне потепління. Підвищення температури, викликане антропогенними змінами клімату, порушує цикли розмноження, рівень виживання та генетичну цілісність водних видів. Водночас галузь аквакультури долає ці виклики за допомогою інноваційних біотехнологічних рішень. Оскільки світова залежність від водних ресурсів зростає для задоволення потреб у продовольчій безпеці, інтеграція передових технологій розведення, включаючи селекційне розведення, геномну селекцію та редагування генів CRISPR/Cas9, пропонує трансформаційний потенціал для вирішення подвійних криз, пов'язаних зі зміною клімату та стійкою аквакультурою.

У цій главі розглядається складна взаємодія між змінами навколишнього середовища та біотехнологічними досягненнями в аквакультурі. Він починається з вивчення того, як глобальне потепління змінює цикли розмноження та динаміку виживання водних видів, викликаючи значні зміни в структурах популяції та функціях екосистем. Потім фокус зміщується на новаторські біотехнологічні рішення, такі як селективне розведення та геномна селекція, які підвищують стійкість і продуктивність видів аквакультури. Крім того, обговорюється революційна технологія редагування генів CRISPR/Cas9, підкреслюючи її застосування для підвищення стійкості до хвороб, темпів росту та адаптації до навколишнього середовища у різних видів риби. Нарешті, розглядаються етичні, екологічні та нормативні міркування, пов'язані з цими технологіями, наголошуючи на необхідності стійких та відповідальних інновацій в аквакультурі.

Наслідки цих дискусій є далекосяжними, вони впливають не лише на майбутнє аквакультури, але й на глобальні зусилля щодо пом'якшення втрати біорізноманіття та наслідків зміни клімату. Цей вступ закладає основу для всебічного аналізу викликів і можливостей, пов'язаних з інтеграцією біотехнології в аквакультуру в умовах глобального потепління.



1. Вплив глобального потепління на розведення водних видів

1.1. Зміни в циклах розмноження: Підвищення температури води може змінити цикли розмноження водних видів, впливаючи на час нересту, швидкість росту та рівень виживання личинок.

Глобальне потепління, викликане зміною клімату, спричиненою діяльністю людини, має глибокий вплив на екосистеми в усьому світі, включаючи водне середовище. Однією з найбільш важливих сфер впливу підвищення температури є розмноження водних видів. Зміни температури води змінюють цикли розмноження, час нересту, швидкість росту та виживання потомства, що призводить до змін у структурі та функціонуванні водних популяцій. Цей огляд літератури має на меті дослідити, як ці зміни навколишнього середовища впливають на водні види, зосереджуючись на змінах у циклах розмноження та генетичній адаптації.

Зміни в циклах розмноження. Підвищення температури води внаслідок глобального потепління є одним із основних чинників змін у репродуктивній поведінці водних видів. Багато видів покладаються на певні температурні сигнали, щоб розпочати розмноження. З підвищенням температури терміни розмноження зміщуються, і ці зрушення можуть призвести до невідповідності між видами та їх середовищем існування.

Час нересту. Дослідження показали, що багато водних видів розмножуються раніше в році через високу температуру води. Наприклад, такі види риб, як атлантична тріска (*Gadus morhua*) і окунь європейський (*Perca fluviatilis*) нерестяться раніше в сезон у відповідь на підвищення температури води (Tompkins et al., 2017). Хоча ранній нерест спочатку може здатися корисним, він часто призводить до невідповідності з наявністю харчових ресурсів для личинок, оскільки фітопланктон, основне джерело їжі для багатьох молодих риб, може бути недоступний одночасно (Durant et al., 2007). Це може призвести до зниження рівня виживання потомства, що ще більше вплине на динаміку популяції.

Крім того, ранній нерест не обов'язково гарантує успіх, оскільки види можуть нереститися до того, як умови будуть оптимальними для виживання личинок. Невідповідність у термінах може призвести до зменшення кількості життєздатного потомства, потенційно призводячи до тривалого скорочення популяції (O'Reilly et al., 2008).

Темпи росту та метаболічні ефекти. Підвищення температури води також впливає на швидкість метаболізму водних видів. Більш висока температура зазвичай прискорює ріст багатьох видів шляхом прискорення метаболічних процесів (Angilletta et al., 2004). Однак таке збільшення швидкості росту не завжди може бути корисним. Види, які надто швидко ростуть у теплих водах, можуть не досягти необхідного розміру чи сили, щоб вижити в дорослому стані, що може призвести до появи слабших особин із меншими шансами на успішне розмноження (Heath et al., 2014). Крім того, швидший ріст не завжди корелює зі збільшенням репродуктивного успіху, оскільки види можуть зіткнутися з невідповідністю в термінах їх розвитку та умов середовища.

Виживаність личинок. Ранні стадії життя водних видів часто є найбільш вразливими до змін навколишнього середовища, і підвищення температури води може ще більше посилити цю вразливість. Підвищені температури можуть знизити рівень кисню у воді, впливаючи на



**Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCa]”**

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

рівень виживання личинок, яким потрібна висока концентрація кисню для належного розвитку (Pörtner et al., 2014). Крім того, високі температури можуть викликати стрес у молодих організмів, залишаючи їх менш здатними справлятися з іншими проблемами навколишнього середовища, такими як хижацтво або дефіцит їжі (Walther et al., 2002).

1.2. Генетична адаптація: деякі види можуть генетично адаптуватися до зміни температури, тоді як інші можуть зіткнутися зі зниженням репродуктивного успіху або зменшенням популяції.

Незважаючи на те, що зміни навколишнього середовища створюють проблеми для водних видів, деякі з них мають потенціал для генетичної адаптації до мінливих умов. Генетична адаптація передбачає зміни в генетичному складі популяцій з часом, що дозволяє видам справлятися зі стресовими факторами навколишнього середовища, включаючи високі температури.

Адаптація до перепадів температури. Дослідження показали, що деякі види продемонстрували певний ступінь генетичної адаптації до підвищення температури. Наприклад, дослідження атлантичної тріски виявили докази місцевої адаптації до різних теплових умов у різних географічних районах (Jorgensen et al., 2017). Деякі популяції тріски, які живуть у теплих водах, розвинули генетичні особливості, які дозволяють їм успішно нереститися при вищих температурах. Подібним чином, деякі види риб можуть демонструвати зміни в часі розмноження або фізіологічній толерантності, адаптуючись до теплішого середовища протягом кількох поколінь (Lynch et al., 2014).

Однак здатність видів до генетичної адаптації обмежена такими факторами, як генетична різноманітність і швидкість, з якою відбуваються зміни середовища. Види з низьким генетичним різноманіттям або ті, що живуть у середовищах існування, що швидко нагріваються, можуть важко адаптуватися досить швидко, щоб уникнути скорочення популяції (Fischer et al., 2014). Крім того, процес генетичної адаптації відбувається повільно, і швидкість потепління може перевищувати здатність деяких видів генетично адаптуватися вчасно.

Зменшення репродуктивного успіху та зменшення популяції. У той час як деякі види можуть успішно адаптуватися до потепління, інші можуть зіткнутися з проблемами, які зменшують їхній репродуктивний успіх або призводять до скорочення популяції. Наприклад, види зі спеціальними вимогами до розмноження, такі як ті, які покладаються на дуже специфічні температурні діапазони для нересту, можуть виявити труднощі впоратися зі швидкими змінами температури, спричиненими глобальним потеплінням (Parmesan, 2006). У таких випадках репродуктивний успіх може знизитися, і чисельність популяції може зменшитися або навіть локально зникнути.

Види, які генетично не адаптуються до підвищення температури, можуть бути не в змозі успішно відтворюватися у своїх рідних середовищах існування, що призводить до втрати генетичного різноманіття та подальшого зниження їхніх шансів на виживання в умовах зміни клімату (Chevin et al., 2010).

Вплив глобального потепління на розмноження водних видів є багатограним, включаючи зміни в циклах розмноження, зміни темпів росту та зміни рівня виживання потомства.



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCа]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

Підвищення температури призвело до більш раннього нересту у багатьох видів, але це може спричинити невідповідність наявності їжі та оптимальних умов навколишнього середовища, що призведе до зниження рівня виживання личинок. У той час як деякі види можуть бути здатні генетично адаптуватися до зміни температури, швидкість зміни навколишнього середовища може перевищувати їхню здатність це робити, що призводить до зниження репродуктивного успіху та потенційного скорочення популяції. Необхідні подальші дослідження, щоб зрозуміти довгострокові наслідки цих змін для водних екосистем і розробити стратегії пом'якшення впливу зміни клімату на ці види.

2. Біотехнологічні досягнення в розведенні аквакультури

2.1 Селективне розведення: використання методів селективного розведення для створення сортів риби та молюсків, які є більш стійкими до високих температур та інших стресів, пов'язаних із кліматом .

Аквакультура є сектором, що швидко розвивається, і робить значний внесок у глобальну продовольчу безпеку. Оскільки клімат продовжує змінюватися, аквакультура стикається зі зростаючими проблемами, такими як підвищення температури та частіші екстремальні погодні явища. Щоб вирішити ці проблеми, біотехнологічні досягнення, зокрема у селекційному розведенні та геномному відборі, все частіше застосовуються для розвитку видів аквакультури, які є більш стійкими до стресів, пов'язаних із кліматом.

Селекційне розведення

Селекційне розведення було наріжним каменем аквакультури протягом десятиліть, допомагаючи підвищити продуктивність і стійкість вирощуваних видів. Процес передбачає відбір особин із бажаними ознаками для відтворення, таким чином поступово покращуючи генетичний склад популяцій. Традиційне селекційне розведення в аквакультурі зосереджено на таких ознаках, як швидкість росту, стійкість до хвороб та ефективність перетворення корму. У зв'язку зі зміною клімату, що посилює стресові фактори навколишнього середовища, все більше уваги приділяється розведенню ознак, які забезпечують більшу стійкість до підвищених температур води та інших викликів, пов'язаних із кліматом.

Дослідження показали, що вибіркове розведення може допомогти таким видам аквакультури, як риба та молюски, адаптуватися до теплішого середовища. Наприклад, дослідження атлантичного лосося показали, що вибіркове розведення може підвищити стійкість до спеки, потенційно дозволяючи вирощуваним популяціям виживати в тепліших водах, що є результатом зміни клімату (Gjølén et al., 2018). Крім того, програми селекційного розведення все більше зосереджуються на таких ознаках, як стійкість до хвороб і здатність протистояти гіпоксичним умовам, які, ймовірно, стануть більш поширеними з підвищенням температури води (Houston et al., 2018).

Селективне розведення для кліматичної стійкості також включає покращення поведінкових рис. Наприклад, риба, яка виявляє більшу толерантність до стресових факторів, таких як скупченість і поводження, може краще протистояти суворішим умовам, спричиненим зміною клімату (Хантінгфорд та ін., 2020). Ці програми розведення спрямовані на те, щоб види



**Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCa]”**

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

аквакультури могли продовжувати процвітати в мінливому кліматі, сприяючи довгостроковій стійкості.

2.2 Геномний відбір: впровадження геномних інструментів для ідентифікації та розповсюдження бажаних ознак, підвищення здатності видів аквакультури процвітати в мінливому кліматі.

Використання сучасної біотехнології для підвищення продуктивності водних видів тримається чудово потенціал ні тільки до зустріти попит але також до покращити аквакультура. Генетичний модифікація та біотехнологія також має величезний потенціал для покращення якості та кількості з риба вирощений в аквакультура. там є а зростаючий попит для аквакультура; біотехнологія може допомогти задовольнити цей попит. Як і у випадку з іншими харчовими продуктами, вдосконаленими біотехнологіями, аквакультура буде бути суворо регульовані раніше затверджено для ринку. біотехнологія аквакультура також пропозиції екологічні переваги. Коли відповідним чином інтегрований з інші технології для в виробництво продуктів харчування, сільськогосподарської продукції та послуг, біотехнології можуть мати значне значення допомога в задоволенні потреб зростаючого та все більш урбанізованого населення в наступне тисячоліття. Успішний розвиток і застосування біотехнології можливі тільки коли широка база досліджень і знань у біології, варіації, селекції, агрономії, фізіології, патології, біохімії і генетика з в маніпулювати організм існує. Переваги пропонується за в нові технології не може бути виконано без продовження прихильність до фундаментальних досліджень. Біотехнологічні програми повинні бути повністю інтегровані в дослідження тло і бути не може виведено з контекст, якщо вони є щоб досягти успіху.

На рисунку 1 показано роль біотехнології у збільшенні виробництва риби.

Геномна селекція, яка використовує геномні інструменти для ідентифікації та поширення бажаних ознак, являє собою великий крок вперед у розведенні аквакультури. Ця техніка передбачає асоціювання генетичних маркерів із цікавими рисами, що дозволяє проводити ефективніший відбір. Геномна селекція може прискорити програми розведення, дозволяючи селекціонерам ідентифікувати особин з найкращим генетичним потенціалом стійкості до стресових факторів навколишнього середовища.

Одним із найбільш перспективних застосувань геномної селекції в аквакультурі є підвищення термостійкості. Дослідження райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) виявило, що геномний відбір можна використовувати для ідентифікації маркерів, пов'язаних із стійкістю до тепла, дозволяючи розвивати штами, які краще оснащені для виживання в теплих водах (Liu et al., 2020). Застосовуючи геномний відбір до програм розведення, види аквакультури можна генетично пристосувати для процвітання в середовищах, які, як очікується, зазнають вищих температур через зміну клімату.



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

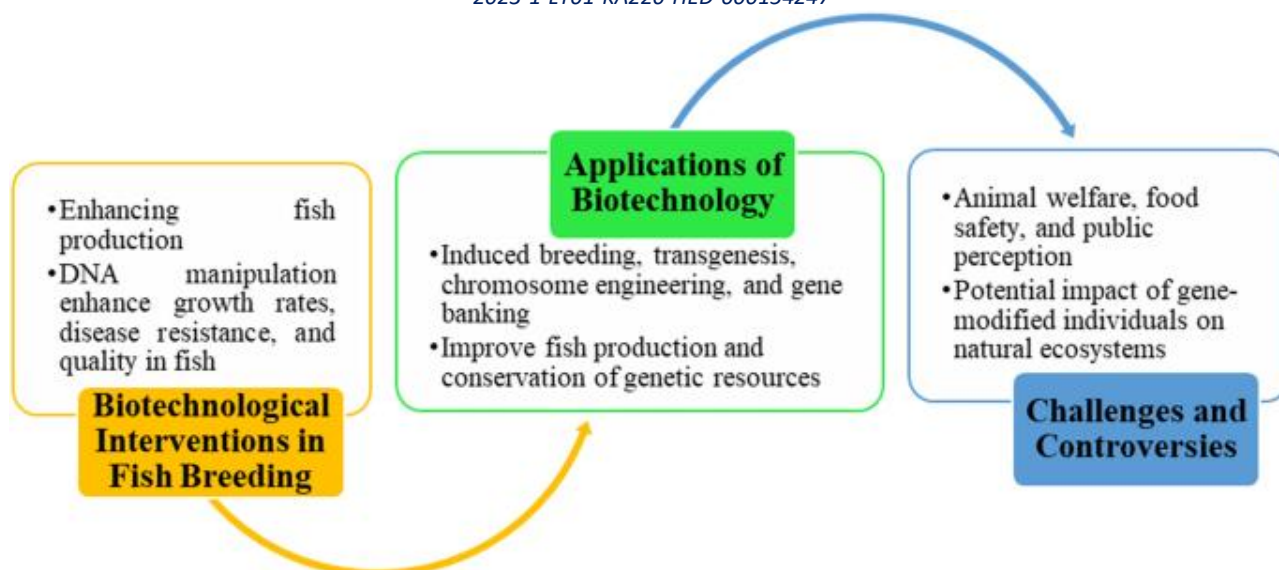


Рисунок 1. Роль біотехнології у збільшенні виробництва риби (Yang et al., 2021).

Окрім термостійкості, геномна селекція використовується для покращення інших пов'язаних із кліматом ознак, таких як стійкість до хвороб і здатність виживати в середовищах з низьким вмістом кисню. Наприклад, геномні інструменти використовуються для ідентифікації генетичних маркерів, пов'язаних зі стійкістю до збудника *Vibrio anguillarum*, який становить значну загрозу для видів аквакультури в теплих водах (Vázquez et al., 2018). Використовуючи геномний відбір для розведення риби, яка є більш стійкою до хвороб, системи аквакультури можуть стати більш стійкими та менш залежними від антибіотиків, які все частіше перебувають під пильною увагою через їхній вплив на навколишнє середовище. Геномна селекція також інтегрується з традиційним селекційним розведенням, щоб максимізувати генетичний прибуток. Поєднання геномної інформації з фенотиповими даними дозволяє селекціонерам приймати більш обґрунтовані рішення про те, яких особин вибрати для відтворення. Наприклад, геномні дані можна використовувати для прогнозування майбутньої продуктивності потомства, допомагаючи уникнути таких проблем, як інбридинг, і забезпечуючи довгострокове генетичне здоров'я популяцій аквакультури (Gjøen et al., 2018).

Інтеграція селективного розведення та геномного відбору

Інтеграція селективного розведення та геномної селекції розглядається як потужна стратегія для забезпечення стійкості видів аквакультури перед обличчям зміни клімату. Селективне розведення забезпечує міцну основу, покращуючи такі ознаки, як швидкість росту та стійкість до хвороб, тоді як геномний відбір прискорює процес і підвищує точність програм розведення. Разом ці методи дозволяють швидко розвивати штами, які краще підходять до мінливих умов середовища.

У випадку атлантичного лосося, наприклад, як селективне розведення, так і геномна селекція були використані для створення штамів, які є більш стійкими до високих температур і хвороб (Gjøen et al., 2018). Поєднання цих двох підходів має потенціал для значного підвищення стійкості аквакультури шляхом розробки штамів, які можуть процвітати в тепліших, більш мінливих умовах навколишнього середовища.



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

Виклики та майбутні напрямки

Незважаючи на те, що досягнення біотехнологій є великими перспективами для покращення розведення аквакультури, існують проблеми, які необхідно вирішити. Однією з ключових проблем є потенціал генетичної гомогенізації у вирощуваних популяціях, що може призвести до депресії інбридингу та зменшення генетичного різноманіття. Для програм розведення вкрай важливо ефективно управляти генетичним різноманіттям, гарантуючи, що види аквакультури залишаться адаптованими до майбутніх змін навколишнього середовища (Houston et al., 2018).

Крім того, впровадження геномної селекції вимагає значних інвестицій у геномні ресурси, включаючи розробку високоякісних еталонних геномів і генетичних маркерів. Незважаючи на те, що останніми роками геномні інструменти стали більш доступними, вартість і складність цих інструментів залишаються перешкодою для деяких галузей аквакультури (Huntingford et al., 2020).

Незважаючи на ці проблеми, постійний розвиток геномних технологій у поєднанні з прогресом у обчислювальних інструментах і стратегіях розведення має великий потенціал для підвищення стійкості видів аквакультури до зміни клімату.

Висновок

Біотехнологічні досягнення в розведенні аквакультури, включаючи селективне розведення та геномну селекцію, пропонують багатообіцяючі рішення проблем, пов'язаних зі зміною клімату. Підвищуючи стійкість видів аквакультури до підвищення температури, хвороб та інших екологічних факторів, ці технології можуть допомогти забезпечити сталість галузі. Інтеграція геномної селекції з традиційними підходами до селекції, ймовірно, буде ключовою стратегією для розробки більш стійких до клімату сортів риби та моллюсків. Оскільки сектор аквакультури продовжує стикатися з тиском зміни клімату, ці біотехнологічні інновації відіграватимуть вирішальну роль у забезпеченні того, щоб аквакультура залишалася життєздатним і стійким джерелом їжі для населення світу.

3. Генна інженерія та CRISPR

3.1. Генна інженерія в аквакультурі

Використання біотехнологічних методів для покращення самопочуття культивованих організмів, підвищення продуктивності та захисту водних екосистем дало обнадійливі результати. Серед них вакцини та імуностимулятори, пробіотики, пребіотики, симбіотики, парaproбіотики, лікування фагами, антимікробні пептиди, генна терапія, РНК-інтерференція та інші біотехнологічні методи лікування. Генетичні досягнення в аквакультурі відіграють вирішальну роль у підвищенні продуктивності, зниженні витрат виробництва та мінімізації впливу на навколишнє середовище.

Приклади методів редагування геномів риб включають CRISPR-Cas9, Нуклеази, подібні до транскрипційних активаторів, і Цинк-пальцеві нуклеази. Молекулярна біологія та трансгенез, банки генів, маніпуляції з хромосомами, гормональне лікування, вирощування риби з одним або кількома батьками, створення риби з різною кількістю клітин (поліплоїдних, триплоїдних, гаплоїдних, гіногенетичних та андрогенних), а також використання синтетичних гормонів у розведенні риби є іншими методами, що використовуються в біотехнології риби.



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCа]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

Інновації в біотехнологічних технологіях зробили революцію в генетичному розведенні риби, що призвело до значного прогресу в галузі аквакультури (Yang et al., 2021).

Такі методи, як генна інженерія та CRISPR-Cas9, уможливили точну модифікацію геномів риби, що призвело до появи штамів із підвищеною швидкістю росту, стійкістю до хвороб та покращеною ефективністю перетворення корму. Програми селекційного розведення були оптимізовані за допомогою селекції за допомогою маркерів, що дозволяє більш ефективно ідентифікувати та розмножувати бажані генетичні ознаки. Крім того, репродуктивні технології, включаючи індукований гормонами нерест і кріоконсервацію гамет, покращили успіх розмноження та генетичне різноманіття. Ці біотехнологічні досягнення сприяли більш стійким і продуктивним методам вирощування риби, задовольнивши зростаючий світовий попит на морепродукти. Ці інструменти відіграють вирішальну роль у запобіганні вимирання видів риби, що перебувають під загрозою зникнення, та покращенні промислового виробництва риби. Крім того, інші біотехнологічні методи, такі як використання синтетичних гормонів, одностатеве виробництво та трансгенез, сприяють розвитку розведення риби. Ці інструменти відіграють важливу роль у запобіганні вимирання видів риби, що перебувають під загрозою зникнення, та збільшенні промислового виробництва риби. Крім того, інші біотехнологічні методи, такі як використання синтетичних гормонів, одностатеве виробництво та трансгенез, значно сприяють прогресу в розведенні риби. На рисунку 2 показано різноманітні біотехнологічні інновації в розведенні риби (Sankaran & Mandal, 2024).

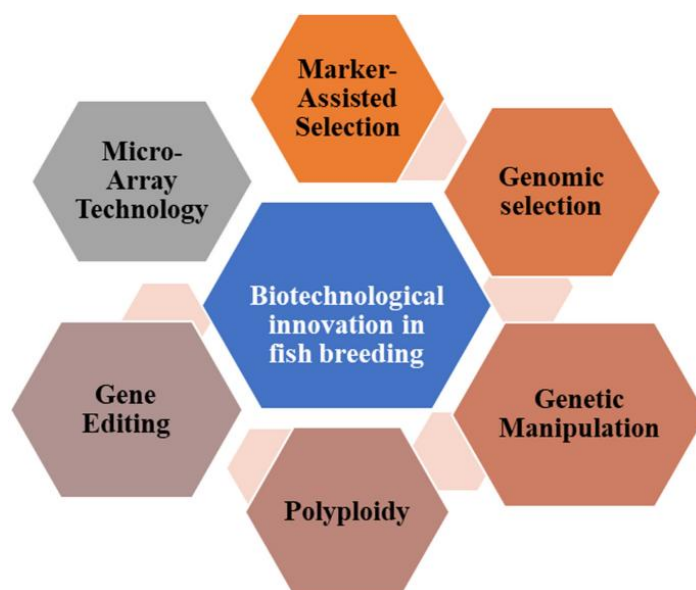


Рисунок 2. Біотехнологічні інновації в рибництві

Генетичне різноманіття є значним ресурсом, який можна використати для започаткування програм селекційного розведення, які, як доведено, значно покращують продуктивність сектору аквакультури. Сприяння передачі навчання та технологій між різними секторами аквакультури може принести значну користь менш цінним видам, підвищуючи їхню продуктивність і сталість.

Геном організму можна модифікувати шляхом введення синтетичної ДНК, отриманої з різних джерел за допомогою процесу, відомого як технологія рекомбінантної ДНК.



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

Імплантація генетичного фрагмента, що містить наш цільовий ген, у існуючий геном є першим кроком у процедурі. У цій техніці рестриктази, вектори та клітини-господарі використовуються як інструменти. У процесах розрізання, синтезу та зв'язування беруть участь різноманітні ферменти. Частиною цієї групи є такі ферменти, як рестриктази. Для транспортування та включення цільових генів корисні вектори. Застосування технології рекомбінантної ДНК включає клонування генів, генну терапію та сільське господарство. На рисунку 3 показано різні етапи технології рекомбінантної ДНК (Sankaran & Mandal, 2024) .

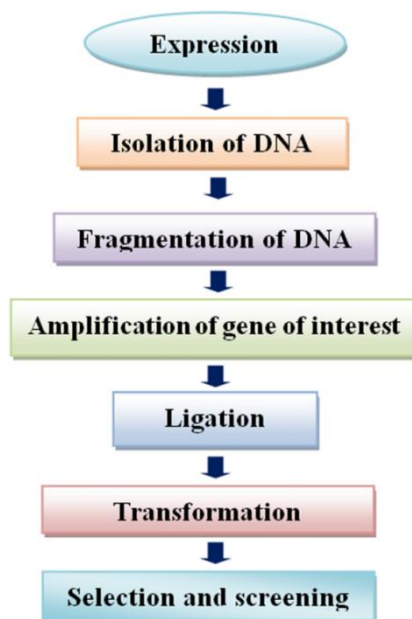


Рисунок 3. Основні етапи технології рекомбінантної ДНК (Sankaran & Mandal, 2024)

3.2. CRISPR в аквакультурі

CRISPR/Cas9 представляє собою революційний інструмент у генній інженерії, що дозволяє точно та цілеспрямовано модифікувати ДНК риб для покращення таких ознак, як пігментація, ріст, якість м'язів та стійкість до хвороб. Ця технологія перевершує традиційні методи розведення, пропонуючи дешевший, простіший і точніший підхід до генетичного вдосконалення. Його застосування включає покращення показників росту (наприклад, маси тіла, довжини та розвитку м'язів), якості м'язів, стійкості до хвороб та визначення статі. Крім того, CRISPR/Cas9 надає багатообіцяючі рішення для підвищення стійкості до хвороб шляхом націлювання на пов'язані з імунітетом гени та шляхи розпізнавання патогенів, зменшуючи потребу в антибіотиках і хімічному лікуванні. Ця технологія значно просунула аквакультуру шляхом генетичної оптимізації ключових ознак видів риб. Наприклад, дослідники успішно маніпулювали зародковими клітинами атлантичного лосося, щоб контролювати диференціацію репродуктивних клітин, покращили ефективність перетворення корму для росту жовтого сома, досягли цільових модифікацій генів тілапії та звели до мінімуму небажані нецільові ефекти (Zhu et al., 2024).

На рисунку 4 показані методи CRISPR/Cas9, які беруть участь у редагуванні генів. Фермент Cas9 і направляюча РНК є двома основними частинами системи. Спрощений варіант системи противірусного захисту CRISPR–Cas9, виявлений у бактеріях, служить основою для системи



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

CRISPR–Cas9. Редагування генів *in vivo* стає можливим шляхом введення в клітину синтетичної направляючої РНК (gRNA) у комплексі з нуклеазою Cas9, а потім розрізання геному в певному місці. Оскільки він дозволяє легко, доступно та точно редагувати геноми *in vivo*, цей метод є дуже важливим у біотехнології та медицині. На додаток до його потенційної користі в боротьбі зі шкідниками та хворобами, він має інші потенційні застосування у розробці нових сільськогосподарських продуктів, генетично модифікованих організмів і фармацевтичних препаратів. Крім того, він є перспективним у лікуванні спадкових розладів і розладів, викликаних соматичними мутаціями, включаючи рак. Система CRISPR/Cas9 пропонує простий РНК-керований метод для викликання цілеспрямованих змін у певних місцях. Деякі фенотипи, включаючи колір очей або схильність до захворювань, можуть бути викликані цими змінами ДНК. У системі використовуються молекули РНК, розроблені для узгодження цільових послідовностей ДНК у поєднанні з ферментом нуклеазою Cas9.

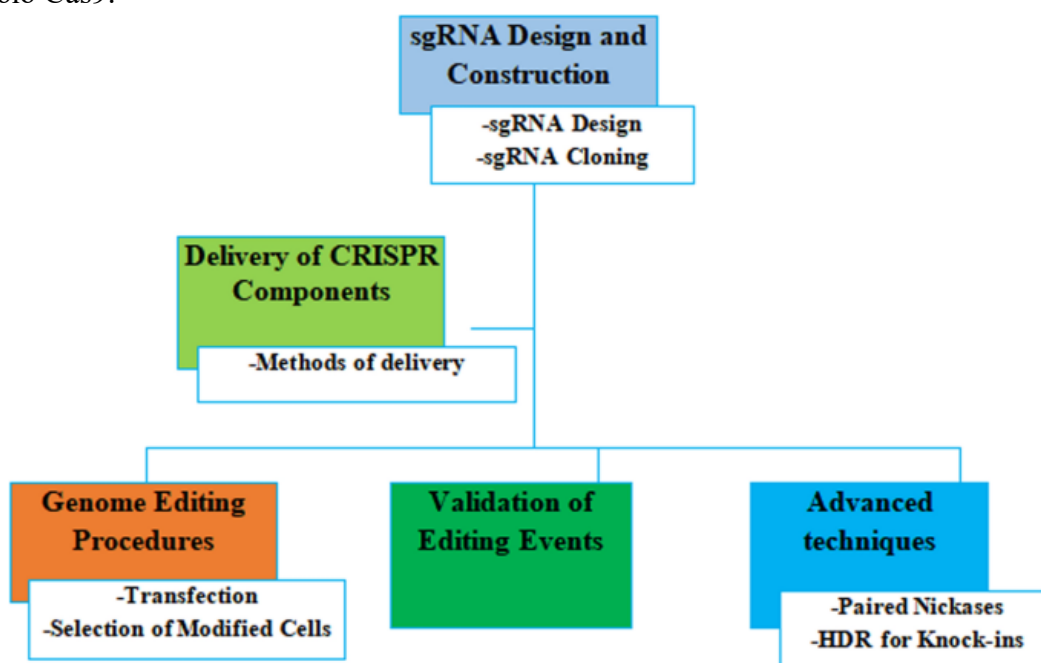


Рисунок 4. Редагування генів CRISPR/Cas9 (Sankaran & Mandal, 2024)

Хоча CRISPR/Cas9 має потенціал для революції в галузі генної інженерії, він не позбавлений своїх обмежень. Точність редагування геному викликає серйозне занепокоєння, оскільки це призводить до постійних змін геному. Крім того, його використання в генетичній модифікації зародкової лінії людини є дуже суперечливим. Загалом, використання редагування генів CRISPR/Cas9 здатне зробити революцію в галузі біотехнології та медицини. Однак вирішальними є прояв обережності та врахування етичних наслідків, пов'язаних із його застосуванням (Sankaran & Mandal, 2024).

3.2.1. Стійкість до хвороб

Стійкість до хвороб є важливою рисою в аквакультурі, що відображає здатність виду протистояти інфекціям, поганий якості води та змінам навколишнього середовища. Редагування геному за допомогою CRISPR/Cas9 стало потужним методом посилення цієї стійкості. Завдяки інтеграції антимікробних пептидних генів (AMG) у геноми риб



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCá]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

CRISPR/Cas9 зменшує колонізацію бактерій, збільшує виживаність після інфікування та змінює експресію імунозалежних генів. Це точне редагування призвело до значних успіхів, таких як підвищення стійкості до інфекційного панкреонекрозу (IPN) і бактеріальної холодноводної хвороби у лосося та націлювання на ген JAM-A у білого амура для блокування проникнення вірусу, що забезпечує імунітет до реовірусу білого амура (GCRV). У тилапії CRISPR/Cas9 відредагував гени, пов'язані з імунною відповіддю, покращуючи стійкість до бактеріальних патогенів, таких як *Streptococcus agalactiae* та *Aeromonas гидрофіла*. Подібним чином у сомів ця технологія спрямована на гени, що регулюють імунітет, підвищуючи рівень виживання після впливу патогенів. Ці досягнення були доповнені технологіями введення чужорідних генів, покращуючи стійкість до хвороб, одночасно підвищуючи ріст і харчову цінність таких видів, як тілапія та сом (Zhu et al., 2024).

3.2.2. Ріст риби і якість м'язів

CRISPR/Cas9 відіграв важливу роль у покращенні темпів росту та якості м'язової маси в різних аквакультурних видах, включаючи нільську тилапію, каналного сома, звичайного коропа та райдужну форель. Використовуючи гени, пов'язані з гормоном росту, такі як *міостатин* (*mstn*), який пригнічує ріст м'язів, дослідники досягли значного збільшення маси тіла та розвитку м'язів. Наприклад, каналний сом із порушеними генами *mstn* продемонстрував збільшення маси тіла на 29,7%, тоді як подібні модифікації оливкової камбали та червоного морського ляща збільшили м'язову масу та оптимізували розмір промислової риби.

Окрім росту, CRISPR/Cas9 дозволяє вивчати процеси розвитку та моделі захворювань людини за допомогою рибок данію, широко використовуваного організму для генетичних досліджень. Трансгенні методи ще більше просунули розведення риби шляхом надмірної експресії генів гормону росту у таких видів, як атлантичний лосось, досягнувши швидкого росту та вищих урожаїв для задоволення глобального попиту на білок. Ці генетичні модифікації в поєднанні з оптимізованим харчуванням і селекційним розведенням покращують текстуру м'язів і загальну ефективність аквакультури (Zhu et al., 2024).

3.2.3. Нецільові ефекти в CRISPR/Cas9

Незважаючи на те, що CRISPR/Cas9 забезпечує неперевершену точність, ефект невідповідності меті залишається проблемою. Ці ненавмисні редагування можуть вплинути на нецільові області геному, потенційно спричиняючи несприятливі наслідки. Нещодавні досягнення, включаючи високоточні варіанти Cas9 (наприклад, SpCas9-HF1, eSpCas9), значно зменшили нецільову активність. Покращений дизайн направляючої РНК (gRNA) і алгоритми, такі як CRISPR-DO, мають підвищену специфічність. Крім того, нові інструменти, такі як базовий і простий редактори, дозволяють точно модифікувати геном без індукції дволанцюгових розривів, мінімізуючи нецільові мутації. Удосконалені системи доставки, такі як наночастинки та вірусні вектори, ще більше підвищують точність програм редагування генів.

Риби данію та інші види аквакультури, включаючи тілапію та атлантичного лосося, отримали вигоду від цих досягнень. Високоточне редагування дозволило дослідникам покращити зростання, стійкість до хвороб та інші ознаки, зберігаючи цілісність генома.

Механізм, який CRISPR/Cas9 використовує для нокауту генів у різних видів риб,



показано на рисунку 5.

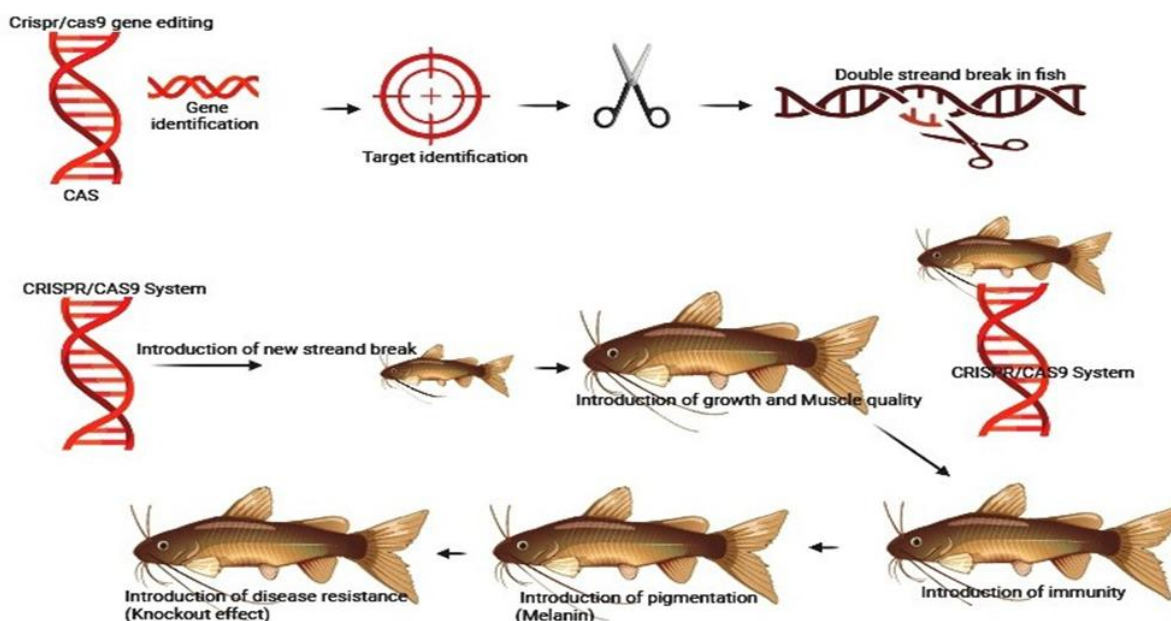


Рисунок 5. Етапи застосування CRISPR/Cas9 в аквакультурі (Спочатку розроблена конкретна гРНК, яка відповідає послідовності цільового гена. Потім білок Cas9 зв’язується з цільовою ДНК, викликаючи дволанцюговий розрив. Нарешті, розрив відновлюється) (Zhu et al., 2024)

3.2.4. Визначення статі

Визначення статі у риб включає генетичні, екологічні та епігенетичні фактори, що робить його складною, але важливою сферою дослідження в аквакультурі. CRISPR/Cas9 висвітлює механізми диференціації статі шляхом точного націлювання на відповідні гени. Наприклад, редагування гена *amh* у нільської тілапії призвело до фенотипічних самок із генетичних самців, що демонструє роль гена у визначенні статі самців. Подібні дослідження на рибках даніо досліджували такі гени, як *dmrt1* і *sox9a*, що виявило полігенну природу визначення статі у цього виду. Крім того, повногеномні скринінги CRISPR/Cas9 виявили основні регулятори, такі як ген *sdY* у райдужної форелі, що покращує наше розуміння статевої диференціації.

3.2.5. Вплив використання CRISPR/Cas9 для редагування генів на різні види риб

CRISPR/Cas9 вирішує проблеми, такі як спалахи захворювань, низькі темпи росту та погіршення навколишнього середовища в аквакультурі. Його застосування поширюється на боротьбу з інвазивними видами, створення мікроорганізмів для відновлення навколишнього середовища та створення генетично модифікованої риби для сталого виробництва. Редагування геному пропонує рішення для покращення ознак риби, одночасно пом’якшуючи екологічний слід аквакультури. Наприклад, трансгенна риба з покращеною ефективністю перетворення корму зменшує використання ресурсів, підтримуючи екологічно чисті практики.

Забезпечивши точні генетичні модифікації, CRISPR/Cas9 змінив аквакультуру,



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

проклавши шлях для сталого та ефективного рибного господарства. Постійне вдосконалення методів редагування, етичних міркувань і управління навколишнім середовищем ще більше оптимізує його застосування в галузі. Таблиця 1 надає стислий перелік ознак, які найчастіше використовуються для редагування геному в рибній аквакультурі (Blix et al., 2021) .

Таблиця 1. Вплив CRISPR/Cas9 на біологічні та екологічні аспекти видів риб

Застосовні області	Впливи
Стійкість до хвороб	Використовується для зменшення зараження вірусом вірусу геморагічної септицемії (VHSV) клітин природного ембріона оливкової камбали хіраме (HINAE).
	Дозволяє редагувати гени таких видів риб, як лосось, тілапія та креветки, щоб підвищити їх стійкість до хвороб.
	Сприяє видаленню гена JAM-A в клітинах білого амура, що значно підвищує стійкість до реовірусної інфекції білого амура (GCRV).
	Сприяє вдосконаленню клітинних ліній риб для вивчення імунної відповіді організму та генетичної стійкості до інфекційних захворювань, використовуючи атлантичного лосося та райдужну форель як модельні системи в аквакультурі
Екологічна адаптація	Допомагає редагувати гени у видів риб, таких як вирощений лосось, щоб адаптуватися до змін середовища
Покращення темпів росту і м'язів	Прискорює ріст м'язів шляхом руйнування генів рецепторів меланокортину (mc4r). Його експериментально випробували на каналному сомі та медаці.
	Покращив швидкість росту та збільшив м'язову масу каналного сома шляхом модифікації гена міостатину в ембріонах каналного сома.
	Це сприяє збільшенню м'язової маси у білого товстолобика завдяки порушенню роботи гена mstna

Технологія редагування генів CRISPR/Cas9 зробила революцію в аквакультурі, забезпечивши точні генетичні модифікації для покращення таких ознак, як стійкість до хвороб, ріст і стійкість. Цей інструмент також полегшує генні драйви, збільшуючи коефіцієнт успадкування сконструйованих генів майже до 100%, прискорюючи поширення бажаних ознак у популяціях.

Li et al., 2021 використали CRISPR/Cas9 для створення стерильної популяції нільської тилапії, що складається лише з самців, що призвело до швидшого росту та зниження екологічних ризиків від втечі вирощеної риби. Подібним чином Wargelius et al. підвищили стійкість атлантичного лосося до захворювань шляхом модифікації генів, необхідних для вірусної інфекції, усунення значних втрат в аквакультурі, спричинених такими патогенами, як IPNV та SAV.

Інші дослідження використовували CRISPR/Cas9 для підвищення стійкості коропа, тилапії та сома до захворювань шляхом впливу на імунозалежні гени або шляхи розпізнавання патогенів. Редагування генів, пов'язане з ростом, також досягло значних успіхів, наприклад, нокаутів міостатину у звичайного коропа, каналного сома та червоного морського ляща, що призвело до збільшення розміру тіла та темпів росту.

Застосування CRISPR/Cas9 виходять за межі виробничих ознак, дозволяючи створювати нові фенотипи. Приклади включають альбіноса нільської тілапії та модифікованих тихоокеанських устриць із посиленням ростом. Універсальність технології також



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

поширюється на такі види, як креветка хребтохвоста, що додатково демонструє її трансформаційний потенціал в аквакультурі (табл. 2).

Таблиця 2. Застосування CRISPR/Cas9 у різних видах риб та його вплив (Zhu et al., 2024)

Види риб	Технологічні впливи
Нільська тилапія	Використовується для створення стерильних популяцій нільської тилапії, що знижує ризик шкоди навколишньому середовищу через втечу риби.
Атлантичний лосось	Допомагає в редагуванні генів для створення видів, які мають високу стійкість до вірусних інфекцій, напр. лосось
Рибка даніо	Дозволяє вченим вивчати мутації та генетичні варіанти рибок даніо. Можна використовувати для успішної інтеграції складених міток в ембріони рибок даніо, що дозволяє точно позначати та візуалізувати клітинні структури або білки. Це відкриває потенціал для вивчення динаміки білків, експресії генів та інших біологічних процесів у цьому модельному організмі.
Райдужна форель	Було показано, що він знижує експресію гена <i>igfbp-2b</i> у райдужної форелі, впливаючи на ріст і розвиток, але його вплив на загальну продуктивність і ендокринну систему залишається неясним.
Атлантичний лосось і райдужна форель	Використовували для націлювання на унікальні гени, пов'язані з ростом та імунітетом клітин атлантичного лосося, райдужної форелі та кижуча.
Японська медака	Має потенціал для збільшення росту м'язів і маси тіла таких видів риб, як медака. Однак необхідні подальші дослідження, щоб визначити його вплив на продуктивність продукції та здоров'я риби.
Оливкова камбала	Можна використовувати для порушення гена міостатину в оливковій камбалі, потенційно збільшуючи вагу тіла та м'язову тканину, але необхідні подальші дослідження, щоб зрозуміти його вплив на ефективність виробництва та здоров'я риби.
Канальний сом	Використовувався для модифікації гена міостатину у канальського сома для покращення росту та якості м'язів, але необхідні подальші дослідження, щоб повністю зрозуміти його вплив.

4. Кріоконсервація та допоміжні репродуктивні технології

4.1. Аквакультура та кріоконсервація

На розведення риби впливає безліч факторів, і навіть найдосвідченіші оператори інкубаційного цеху часто стикаються з частковими або повними збоями в процесі розведення. Щоб отримати бажану кількість насіння, індуковане розмноження широко вважається ефективним методом. Такий підхід сприяє дозріванню та нересту риби за несприятливих умов, таких як недостатня кількість опадів або екстремальні кліматичні сценарії. Однак повторні спроби розведення можуть мати значний вплив на здоров'я маточного поголів'я протягом їх обмеженого терміну служби. Заміна плідників є складною через логістичні та фізіологічні проблеми, пов'язані з їх транспортуванням. Отже, транспортування гамет стало багатообіцяючою альтернативою, яка пропонує переваги, подібні до тих, які спостерігаються у тваринництві.

Інтеграція біотехнологічних інструментів у програми розведення риби має важливе значення для забезпечення послідовного та сталого виробництва насіння. Кріоконсервація є життєздатним рішенням для виробництва високоякісного насіння та генетично кращих



**Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCa]”**

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

сортів риби. Визнаючи його потенціал, Продовольча та сільськогосподарська організація (FAO) визначила кріоконсервацію як критичну стратегію збереження генетичних ресурсів риби (Betsy та ін., 2022).

Кріоконсервація відноситься до збереження біологічних зразків при надзвичайно низьких температурах, ефективно припиняючи метаболічні процеси та зберігаючи структурну та функціональну цілісність протягом невизначеного періоду часу. Ця технологія стала наріжним каменем репродуктивної біології, пропонуючи важливі переваги для галузей тваринництва та аквакультури. Підтримуючи температуру нижче -130°C , метаболічна діяльність повністю припиняється, що дозволяє біологічним зразкам, таким як клітини, тканини та навіть цілі організми, залишатися життєздатними після розморожування. Кріоконсервація має особливе значення для збереження цінного генетичного матеріалу, покращення програм розведення та підтримки зусиль зі збереження біорізноманіття (Fletcher & Rise, 2012).

4.2. Основні принципи кріоконсервації клітин

4.2.1. Механізми збереження

Кріоконсервація дозволяє зберігати гамети протягом тривалих періодів, часто охоплюючи кілька років, без істотного впливу на їх здатність до запліднення. При зниженні температури приблизно до -196°C усі біологічні та біохімічні процеси припиняються, запобігаючи процесам, які призводять до загибелі клітин і деградації ДНК. Ця техніка є потужним інструментом для підтримки довгострокової стійкості аквакультури та збереження біорізноманіття.

Однак утворення льоду в біологічних системах є серйозною проблемою, оскільки це може призвести до механічних пошкоджень і осмотичного дисбалансу. Контрольовані процеси охолодження забезпечують позаклітинне утворення льоду, тим самим створюючи градієнт концентрації, який сприяє відтоку води з клітин. Цей процес запобігає смертельному утворенню внутрішньоклітинного льоду. Прогрес у кріопротекторних агентах (CRA) відіграв ключову роль у пом'якшенні цих ушкоджень, дозволяючи успішно зберігати різноманітні типи клітин, тканин і малих біологічних структур. Уточнюючи взаємодію між швидкостями охолодження, концентраціями CRA та властивостями клітини, дослідники покращили результати кріоконсервації.

4.2.2. Кріопротекторні агенти

Кріопротекторні агенти відіграють важливу роль у зменшенні утворення внутрішньоклітинного льоду та підтримці цілісності білків і мембран під час заморожування та відтавання. Ці агенти поділяються на дві категорії: проникні та непроникні. Проникні CRA, такі як ДМСО, гліцерин і метанол, проникають через клітинну мембрану, щоб збалансувати внутрішньоклітинний і позаклітинний осмотичний тиск. Непроникні CRA, включаючи цукор і певні білки, в основному діють поза клітинами, змінюючи температуру замерзання розчину та забезпечуючи додатковий захист. Незважаючи на їхні переваги, CRA слід використовувати обережно, оскільки вони можуть викликати токсичність, осмотичний стрес і хромосомні аномалії, якщо застосовувати їх неправильно. Збалансування захисних ефектів і потенційних несприятливих результатів є важливою сферою поточних досліджень.



4.2.3. Охолодження та розморожування

Успіх кріоконсервації значною мірою залежить від точного контролю протоколів охолодження та розморожування. Контрольовані швидкості замерзання, як правило, від $-40^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до нижчих, необхідні для мінімізації утворення кристалів льоду. Для досягнення цих контрольованих умов широко використовуються спеціальні біоморозильники та методи випаровування азоту. І навпаки, відтавання має бути швидким, щоб запобігти рекристалізації льоду, яка може серйозно пошкодити клітинні структури. Нові технології, включаючи програмовані пристрої для заморожування та передові методи розморожування, спрямовані на стандартизацію та оптимізацію цих процесів для різних біологічних матеріалів, тим самим підвищуючи рівень виживання та функціональне відновлення (Fletcher & Rise, 2012) .

4.3. Кріоконсервація гамет

4.3.1. Кріоконсервація сперми

Кріоконсервація сперми являє собою одне з найуспішніших застосувань кріобіології з добре налагодженими протоколами у тваринництві та розширенням застосування в аквакультурі. Однак сперма риб демонструє значні відмінності від сперми ссавців, що вимагає унікальних підходів. Основні характеристики сперматозоїдів риб включають їх нерухомість у насіннєвій плазмі, активацію рухливості під впливом активуючих розчинів, високу чутливість до осмотичних змін і відносно низьку продукцію АТФ. Ці унікальні риси підкреслюють необхідність адаптованих стратегій кріоконсервації для забезпечення життєздатності та функціональності після розморожування.

Розробка ефективних протоколів кріоконсервації сперми риб включає кілька важливих кроків:

Збір сперми: Отримання високоякісної сперми без забруднюючих речовин є важливим. Залежно від виду зазвичай використовуються такі методи, як масаж живота, аспірація або пряме вилучення яєчок. Слід бути обережним, щоб уникнути забруднення такими речовинами, як сеча, які можуть передчасно активувати моторику.

Аналіз якості: Оцінка якості сперми має вирішальне значення для відбору зразків, придатних для заморожування. Такі параметри, як рухливість, життєздатність, рН і осмоляльність, оцінюються, часто з використанням передових комп'ютеризованих систем для забезпечення точності.

Формула наповнювача: наповнювачі — це буферні розчини, призначені для запобігання передчасній активації моторики та забезпечення оптимального середовища для заморожування. Загальні компоненти включають глюкозу, яєчний жовток, антиоксиданти та СРА, такі як ДМСО або гліцерин. Вибір розширювача залежить від виду та конкретних вимог.

Заморожування та розморожування: сперму зазвичай завантажують у соломинки або кріопробірки та заморожують із контрольованою швидкістю перед зберіганням у рідкому азоті (-196°C). Щоб забезпечити максимальну життєздатність, слід швидко розморозити на водяній бані. Рисунок 6 ілюструє процедури заморожування сперми



Рисунок 6. Процес заморожування сперми: (A) екстракція сперми форелі канюляцією , (B) розведення в розширювачі кріопротектора , (C) заповнення французьких соломок об'ємом 0,5 мл (додаються різні типи соломок, кріовіали та порошок ПВА для герметизації соломок), (D) заморожування над плаваючим пристроєм у коробці з пінополістиролу , що містить рідкий азот (N_2I), (E) зберігання в контейнері з рідким азотом, (F) видушування ікри у самки, (G) розморозування сперми у водяній бані та (H–J) запліднення (Fletcher & Rise, 2012)

4.3.2. Кріоконсервація ооцитів

На відміну від сперми, яйцеклітини представляють значні проблеми для кріоконсервації. Їх великий розмір, складна структура та обмежена проникність для CPA роблять їх дуже сприйнятливими до кріопошкодження . Особливо виражені такі проблеми, як чутливість до охолодження, утворення внутрішньоклітинного льоду та токсичність CPA. Крім того, наявність кількох мембранних шарів і високий вміст ліпідів ще більше ускладнює процес збереження.

Останні дослідження зосереджені на збереженні ооцитів на ранніх стадіях розвитку, де їх структурна простота може зменшити сприйнятливість до кріопошкодження. Стратегії включають поступове видалення CPA для мінімізації токсичності, дослідження стійкості до охолодження та застосування методів вітрифікації . Вітрифікація , яка передбачає надшвидке заморожування з високою концентрацією CPA, пропонує багатообіцяючу альтернативу, усуваючи утворення кристалів льоду. Проте залишаються проблеми з досягненням рівномірного розподілу CPA та мінімізації токсичності.

4.4. Кріоконсервація ембріонів

Кріоконсервація рибних ембріонів, метою якої є збереження як материнського, так і батьківського генетичного матеріалу, має значний потенціал для покращення репродуктивного менеджменту аквакультури. Незважаючи на перспективи, успішне



**Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCa]”**

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

кріоконсервування рибних ембріонів залишається проблемою через біологічні складності ембріонів, такі як їх великий розмір, багатокамерна структура та обмежена проникність для кріопротекторів (CPA). Ці фактори, у поєднанні з наявністю таких бар'єрів, як синцитіальний шар жовтка (YSL), перешкоджають ефективному розподілу CPA та води в ембріоні (рис. 7, Hagedorn et al., 1997).

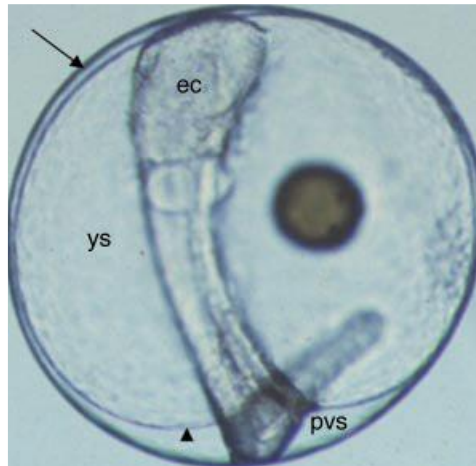


Рисунок 7. Ембріон калкана на стадії хвостової бруньки демонструє різні оболонки та компартменти: хоріон (стрілка), жовтковий синцитіальний шар (наконечник стріли), жовтковий мішок (ys), перивітеліновий простір (pvs) і ембріональний компартмент (ec) (Hagedorn et al., 1997)

Однією з основних перешкод є високий вміст води в ембріонах, що може призвести до утворення льоду та пошкодження клітин під час заморожування та відтавання. Ембріони на ранніх стадіях, які теоретично пропонують простіші структурні властивості для збереження, дуже чутливі до охолодження та токсичності CPA, що ще більше ускладнює зусилля з кріоконсервації.

Дослідження чутливості рибних ембріонів до охолодження показали, що ранні стадії розвитку більш вразливі до низьких температур, ніж пізніші. Стратегії пом'якшення травм від охолодження включають модифікацію структури ембріона та використання захисних речовин, таких як білки-антифризи (AFP). Ці підходи продемонстрували потенціал для підвищення стійкості до низьких температур, але ще не досягли стабільного успіху.

Використання вітрифікації, техніки, яка усуває утворення льоду шляхом надшвидкого заморожування, було запропоновано як спосіб подолання цих проблем. Однак для вітрифікації потрібні високі концентрації CPA, які можуть бути токсичними та їх важко рівномірно розподілити всередині ембріона через їх обмежену проникність. Для усунення цих обмежень досліджуються різні експериментальні методи, такі як підвищення проникності ембріона та вдосконалення систем доставки CPA.

Останні досягнення включають методи обходу таких бар'єрів, як YSL, і покращення проникнення CPA. Такі методи, як мікроін'єкції CPA або генна інженерія для підвищення проникності ембріонів, показали перспективу. Крім того, використання природних антифризних протеїнів продемонструвало потенціал для зменшення утворення кристалів льоду та пом'якшення пошкоджень, спричинених замерзанням. Хоча ці методи все ще



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

знаходяться на стадії експерименту, вони пропонують цінну інформацію про майбутнє кріоконсервації ембріонів.

Подолання проблем кріоконсервації рибних ембріонів вимагатиме міждисциплінарної співпраці та технологічних інновацій. Зусилля зосереджені на посиленні кріозахисту на клітинному рівні та вдосконаленні методів доставки СРА. Перспективні напрямки включають використання передових лазерних технологій для створення тимчасових пор в ембріонах і створення генетично модифікованих штамів з підвищеною стійкістю до ушкоджень заморожуванням.

За умови продовження досліджень кріоконсервація рибних ембріонів може стати надійним інструментом для аквакультури, сприяючи збереженню генетичних ресурсів і сприяючи сталим практикам у рибництві.

4.5. Кріоконсервація ембріонів

Технологія кріоконсервації була розроблена для багатьох видів риб (Betsy та ін., 2022):

- Ця технологія може бути використана для збереження молока найкращої вікової групи брудера, який можна використовувати в будь-який момент часу в майбутньому.
- Це також може усунути проблему інбридингу, оскільки кріоконсервовані сперматозоїди можна легко обмінювати між інкубаторіями.
- Використовуючи цю технологію, сперматозоїди можуть бути доступні в будь-яку пору року.
- Це дає можливість розмноження в міжсезоння.
- Він синхронізує доступність гамет обох статей, що призводить до економії сперми.
- Це спрощує догляд за плідниками на фермах.
- Це допомагає отримати життєздатне і міцне потомство шляхом внутрішньовидової гібридизації.
- Він долає труднощі, що виникають через короткий час життєздатності гамет.
- Це дозволяє генетично зберегти бажані лінії.
- Це дозволяє проводити схрещування в різні пори року.
- Це допомагає зберігати зародкову плазму для програм генетичного відбору або збереження видів.
- Кріоконсервовані сперматозоїди можуть допомогти в програмах гібридизації та генно-інженерних дослідженнях риб.
- Це веде до багатьох інших шляхів, таких як кріобанкінг життєздатних гамет, як у випадку тваринництва, і розвиток банку генів і генетичні маніпуляції в рибах.

Кріоконсервація є трансформаційним інструментом у біотехнології аквакультури, пропонуючи значні переваги для генетичного збереження, програм розведення та збереження біорізноманіття. Незважаючи на те, що проблеми залишаються, зокрема у збереженні ембріонів і ооцитів, поточний прогрес у кріопротекторних методах, генетичних інструментах і міждисциплінарних дослідженнях є перспективними для подолання цих бар'єрів. Майбутні розробки, ймовірно, розширять масштаби та ефективність кріоконсервації, забезпечуючи її ширше застосування в аквакультурі та за її межами. Завдяки постійним інноваціям кріоконсервація готова відігравати важливу роль у підтримці сталого розвитку аквакультури та збереження водного біорізноманіття (Fletcher & Rise, 2012).



5. Етичні, екологічні та нормативні аспекти в біотехнології аквакультури

5.1. Етичні проблеми в біотехнології аквакультури

5.1.1. Добробут тварин у генетичній модифікації

Етичні наслідки генетичної модифікації в аквакультурі є глибокими, особливо щодо добробуту тварин. Генетичні втручання, такі як трансгенез і редагування генів, часто спрямовані на покращення виробничих ознак, таких як швидкість росту, стійкість до хвороб або толерантність до навколишнього середовища. Однак ці модифікації можуть ненавмисно спричинити фізіологічний стрес або ускладнення зі здоров'ям. Наприклад, прискорене зростання трансгенних риб може призвести до деформацій скелета, зниження імунної функції або зміни швидкості метаболізму. Критики стверджують, що надання переваги продуктивності над добробутом може поставити під загрозу етичне поводження з цими організмами, викликаючи питання про баланс між інноваціями та гуманними практиками. Обмежений характер систем аквакультури ще більше посилює ці занепокоєння. Риба, яка вирощується в такому середовищі, часто піддається високій щільності посадки, що призводить до стресу, сприйнятливості до хвороб і змін у поведінці. Етичні міркування поширюються на те, чи генетично модифікована риба більш чи менш придатна для процвітання в таких умовах порівняно з її дикими побратимами. Розробка показників добробуту, спеціально розроблених для генетично змінених водних видів, має важливе значення для забезпечення того, щоб якість їхнього життя не була надмірно скомпрометована.

5.1.2. Екологічна цілісність і біорізноманіття

Окрім індивідуального добробуту, етичні проблеми охоплюють ширший екологічний вплив біотехнологічних втручань. Впровадження генетично модифікованих або селективно виведених видів у системи аквакультури чи природні середовища проживання створює ризик для екологічної цілісності. Наприклад, трансгенна риба з підвищеними темпами росту може випередити місцеві види за ресурси, порушуючи місцеві екосистеми та потенційно призводячи до зменшення чи зникнення диких популяцій. Ці занепокоєння підкреслюють моральну відповідальність за те, щоб застосування біотехнології не підривало біорізноманіття та стійкість водних екосистем.

Етичні дебати також торкаються питання управління біорізноманіттям людини. Хоча біотехнологія може допомогти у збереженні, наприклад, шляхом кріоконсервації генетичного матеріалу видів, що знаходяться під загрозою зникнення, вона також викликає питання щодо права людства змінювати генетичні коди в економічних чи екологічних цілях. Встановлення балансу між використанням біотехнології для отримання позитивних результатів і збереженням природних еволюційних процесів водних видів залишається ключовим етичним викликом.

5.2. Нормативна база

5.2.1. Глобальні стандарти та рекомендації

Управління застосуванням біотехнологій в аквакультурі є складною сферою, яка розвивається. Міжнародні організації, такі як Продовольча та сільськогосподарська



**Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCа]”**

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

організація (FAO) і Конвенція про біологічне різноманіття (CBD), створили рамки для безпечного та етичного використання біотехнології. У цих настановах наголошується на принципі запобіжних заходів, пропагуючи ретельну оцінку ризику та моніторинг перед схваленням і випуском генетично модифікованих організмів (ГМО) у системи аквакультури.

Одним із ключових аспектів глобальних стандартів є гармонізація нормативних актів між країнами для забезпечення узгодженості заходів безпеки та захисту навколишнього середовища. Це особливо важливо, враховуючи транскордонний характер водних екосистем і потенційну можливість для втікачів впливати на води сусідніх країн. Співпраця між країнами за допомогою договорів і угод відіграє вирішальну роль у встановленні єдиної практики та зменшенні ризиків

5.2.2. Національні регуляторні підходи

На національному рівні нормативно-правова база значно відрізняється, відображаючи різні пріоритети, технологічний потенціал і ставлення суспільства до біотехнології. Деякі країни, такі як Сполучені Штати та Канада, мають надійні системи оцінки безпеки та ефективності генетично модифікованих організмів, включаючи широкі процеси перевірки, що включають наукові оцінки, оцінку навколишнього середовища та оцінку стану здоров'я населення. Навпаки, в інших регіонах можуть бути відсутні комплексні регуляторні структури, що призводить до прогалин у нагляді та потенційних ризиків.

Регуляторні підходи часто включають багатоетапні процеси, починаючи з лабораторних випробувань і переходячи до контрольованих польових випробувань перед повномасштабним впровадженням. Ці процеси спрямовані на оцінку екологічних, економічних і соціальних наслідків нових біотехнологій. Громадські консультації та прозорість все частіше визнаються критичними компонентами нормативно-правової бази, що зміцнює довіру та гарантує, що рішення відображають суспільні цінності.

5.2.3. Оцінка безпеки та процеси затвердження

Оцінки безпеки займають центральне місце в нормативно-правовій базі, забезпечуючи наукову основу для оцінки потенційних ризиків застосування біотехнології. Ці оцінки зазвичай стосуються кількох ключових сфер:

Екологічні ризики: Оцінка ймовірності втечі та потенційного екологічного впливу ГМО, включаючи конкуренцію з місцевими видами, гібридизацію та зміну середовища проживання.

Ризики для здоров'я людини: забезпечення того, що генетично модифікована риба, призначена для споживання, не містить алергенів, токсинів або ненавмисних генетичних ефектів, які можуть завдати шкоди споживачам.

Моніторинг екосистеми: впровадження програм моніторингу після схвалення для виявлення та пом'якшення непередбачених впливів, забезпечення довгострокової стійкості.

Процеси схвалення часто передбачають координацію між кількома відомствами, включаючи органи охорони навколишнього середовища, сільського господарства та охорони здоров'я. Суворі наукові оцінки в поєднанні з громадськістю мають на меті збалансувати інновації з міркуваннями безпеки та етики.



5.3. Вплив біотехнології аквакультури на навколишнє середовище

5.3.1. Динаміка екосистем і генетичне забруднення

Одним із найбільш значних екологічних ризиків біотехнології аквакультури є генетичне забруднення, коли гени генетично модифікованих або селективно виведених видів передаються диким популяціям. Це може відбуватися через схрещування, що призводить до генетичної гомогенізації та втрати місцево адаптованих ознак у диких видів. Довгострокові наслідки такої генетичної інтрогресії включають зниження стійкості до змін навколишнього середовища та зменшення біорізноманіття.

Вплив селекції одомашнення на генетичні та фенотипові характеристики тварин аквакультури призводить до різних потенційних впливів на навколишнє середовище після випуску в природу. На рис. 8 узагальнено механізми, відповідальні за такий вплив, у чотирьох категоріях: прямі екологічні ефекти, непрямі екологічні ефекти, прямі генетичні ефекти та непрямі генетичні ефекти.

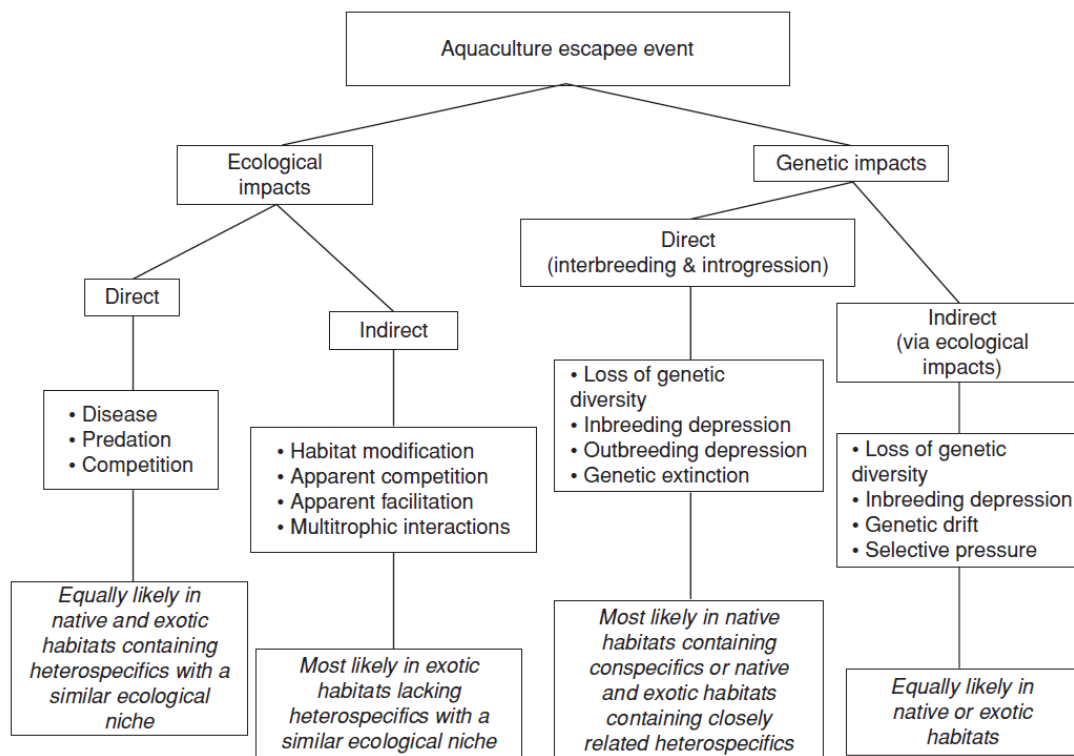


Рисунок 8. Можливий вплив аквакультури на навколишнє середовище

Системи аквакультури особливо вразливі до втечі, коли вирощена риба потрапляє в природні екосистеми. Ці втікачі можуть випередити дикі популяції за ресурси, занести хвороби та порушити динаміку харчової мережі. Щоб пом'якшити ці ризики, потрібні надійні стратегії стримування, такі як фізичні бар'єри та розвиток стерильних генетично модифікованих риб, щоб запобігти розмноженню в дикій природі.

5.3.2. Взаємодія з дикими популяціями

Взаємодія між вирощеними та дикими популяціями виходить за рамки генетичного впливу. Трансгенна риба з покращеними властивостями, такими як швидший ріст або більша



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

стійкість до хвороб, може мати екологічні переваги над своїми дикими побратимами. Ці переваги можуть призвести до змін у стосунках між хижаками та жертвами, зміни динаміки конкуренції та змін у використанні середовища існування.

Дослідження поведінки та екологічної ролі генетично модифікованої риби має важливе значення для передбачення та управління цими взаємодіями. Довгострокові екологічні дослідження в поєднанні з прогностичним моделюванням можуть допомогти визначити потенційні ризики та скерувати методи управління.

5.3.3. Довгострокова стійкість

Забезпечення довгострокової стійкості біотехнології аквакультури вимагає цілісного підходу, який враховує екологічні, економічні та соціальні аспекти. Це включає мінімізацію руйнування середовища проживання, оптимізацію використання ресурсів і захист диких популяцій. Досягнення в галузі біотехнології, такі як розробка екологічно чистих кормів і вдосконалення систем управління відходами, можуть сприяти більш стійким практикам аквакультури.

Моніторинг і адаптивне управління є критичними компонентами стійкої аквакультури. Постійно оцінюючи вплив біотехнологічних заходів на навколишнє середовище та відповідним чином коригуючи практику, зацікавлені сторони можуть збалансувати продуктивність та екологічну відповідальність

5.4. Баланс між прогресом і відповідальністю

Інтеграція біотехнології в аквакультуру відкриває величезні можливості для вирішення глобальних проблем, таких як продовольча безпека та збереження біорізноманіття. Однак цей прогрес має супроводжуватися твердою прихильністю до етичних принципів, суворим регулятивним наглядом і проактивним захистом навколишнього середовища. Заохочуючи співпрацю між науковцями, політиками, зацікавленими сторонами галузі та громадськістю, аквакультура може розвиватися інноваційним та стійким способом.

Етичні, екологічні та регуляторні міркування є не просто перешкодами, які необхідно подолати, а є невід’ємною частиною відповідального розвитку біотехнології аквакультури. Завдяки ретельному плануванню, прозорому прийняттю рішень і постійним дослідженням цей сектор може реалізувати свій потенціал, одночасно захищаючи благополуччя водних екосистем і спільнот, які від них залежать (Fletcher & Rise, 2012).

Резюме

Глобальне потепління значно порушило цикли розмноження, темпи росту та виживання водних видів. Підвищення температури води змінює час нересту та швидкість метаболізму, що призводить до невідповідності наявності їжі та неоптимальних умов для розвитку личинок. Такі види, як атлантична тріска та європейський окунь, розмножуються раніше, що призводить до зниження рівня виживання їхнього потомства. Крім того, підвищені температури можуть знизити рівень кисню у воді, викликаючи стрес у личинок і впливаючи на розвиток молоді. У той час як деякі види демонструють генетичні адаптації, щоб справлятися з цими змінами, швидкі зміни навколишнього середовища часто випереджають здатність популяцій адаптуватися, що призводить до довгострокового зниження.



**Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCá]”**

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

Аквакультура застосувала біотехнології, щоб пом'якшити ці проблеми та підвищити стійкість вирощуваних видів. Програми селекційного розведення зосереджені на таких ознаках, як стійкість до спеки, стійкість до хвороб і ефективність росту. Геномний відбір прискорює цей процес, використовуючи генетичні маркери для поширення бажаних ознак. Наприклад, атлантичного лосося вирощували, щоб він витримував високі температури та умови гіпоксії, тоді як геномні інструменти використовувалися для створення стійких до хвороб сортів райдужної форелі та інших видів.

Технологія CRISPR/Cas9 стала революційним інструментом в аквакультурі, що дозволяє проводити точні та цілеспрямовані модифікації геномів риб. Цей метод дозволяє покращити ключові риси, такі як ріст, якість м'язів, стійкість до хвороб і адаптація до навколишнього середовища. Наприклад, генетичні модифікації таких видів, як нільська тилapia та каналльний сом, призвели до швидшого зростання та покращили розвиток м'язів завдяки націлюванню на ген міостатину (*mstn*). Подібним чином CRISPR/Cas9 використовувався для підвищення стійкості до хвороб атлантичного лосося та білого амура шляхом редагування імунозалежних генів і шляхів розпізнавання патогенів.

Окрім покращення індивідуальних рис, CRISPR має застосування у визначенні статі та управлінні популяцією. Такі методи, як створення стерильних популяцій, зменшують екологічні ризики, пов'язані з втечею вирощеної риби. Незважаючи на ці досягнення, технологія не позбавлена проблем. Нецільові ефекти та етичні проблеми, пов'язані з редагуванням геному, особливо з точки зору добробуту тварин і екологічних ризиків, вимагають жорсткого регуляторного нагляду та подальших досліджень.

Кріоконсервація є ще однією ключовою технологією, яка пропонує рішення для збереження генетичних ресурсів і ефективності селекції. Зберігаючи гамети та ембріони при наднизьких температурах, ця техніка підтримує програми збереження біорізноманіття та розведення в різні сезони та географічні умови. Однак такі проблеми, як чутливість до охолодження та токсичність кріопротекторів, особливо в ооцитах і ембріонах, підкреслюють необхідність постійних досліджень для оптимізації протоколів і підвищення рівня успіху.

Інтеграція біотехнології в аквакультуру породжує глибокі етичні та екологічні питання. Потенціал генетично модифікованих організмів (ГМО) проникати в природні екосистеми та схрещуватися з дикими популяціями створює ризики для генетичної цілісності та біорізноманіття. Нормативно-правова база як на національному, так і на міжнародному рівнях відіграє вирішальну роль у вирішенні цих проблем, наголошуючи на оцінці ризиків, моніторингу та залученні громадськості. Етичні міркування поширюються на добробут тварин, зокрема, щоб біотехнологічні втручання не шкодили здоров'ю та благополуччю тварин, що вирощуються.

Майбутнє аквакультури залежить від балансу між технологічним прогресом і стійкістю. Такі інновації, як CRISPR/Cas9 і геномна селекція, мають величезний потенціал для підвищення стійкості та продуктивності. Однак міждисциплінарна співпраця, надійне управління та піклування про навколишнє середовище є важливими для мінімізації екологічного впливу та забезпечення довгострокової життєздатності. Віддаючи пріоритет етичним практикам і стійкості, аквакультура може відігравати ключову роль у вирішенні глобальних проблем продовольчої безпеки та збереженні водного біорізноманіття.



Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCa]”

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

У цьому розділі підкреслюється нагальність вирішення взаємопов'язаних проблем зміни клімату та стійкості аквакультури за допомогою інноваційних та відповідальних біотехнологічних рішень. Використовуючи потенціал цих досягнень, галузь аквакультури може зробити свій внесок у глобальні зусилля зі збереження біорізноманіття, стійкості до зміни клімату та продовольчої безпеки.

Список літератури

- 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*.
- Parnesan, 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>



**Цифровий синій носій для пост-вуглецевого майбутнього - інновації в навчальній програмі з
аквакультури [DiBluCa]”**

2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

- 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.