



Funded by
the European Union



Skaitmeninė mėlynoji karjera įveikus anglies krizę – akvakultūros mokymo programos naujovės [DiBluCa]
2023-1-LT01-KA220-HED-000154247

3 modulis. Pasaulinis atšilimas ir veisimas, biotechnologijų taikymas akvakultūroje

Prof. dr. Halyna Krusir

Prof. dr. Maryna Mardar

Doc. dr. Olha Sahdiejeva

Odesos nacionalinis technologijos universitetas

Turinys

Išvadas	2
1. Klimato kaita ir vandens rūšių reprodukcija	2
1.1. Dauginimosi ciklų pokyčiai	2
1.2. Genetinis prisitaikymas prie klimato kaitos	3
2. Pažangūs veislininkystės metodai	4
2.1. Selekcinis veisimas	4
2.2. Genominė atranka	5
3. Genų inžinerija ir CRISPR	7
3.1. Genų inžinerija akvakultūroje	7
3.2. CRISPR metodo galimybės	9
4. Kriokonservavimas ir pagalbinis apvaisinimas	15
4.1. Ląstelių ir gametų kriokonservavimas	15
4.2. Embrionų kriokonservavimas	18
5. Etiniai, aplinkosaugos ir reguliavimo aspektai	20
5.1. Biotechnologijų etika ir visuomenės požiūris	20
5.2. Teisiniai ir reguliavimo iššūkiai	21
5.3. Biotechnologijų poveikis aplinkai ir atsakomybė	22
Santrauka	24
Literatūra	26



Įvadas

Vandens ekosistemos, itin svarbios pasaulio biologinei įvairovei ir žmonių gerovei, dėl pasaulinio atšilimo patiria precedento neturinčių pokyčių. Dėl kylančios temperatūros, kurią lemia antropogeninė klimato kaita, trikdomas vandens organizmų dauginimosi ciklas, mažėja išgyvenamumas ir kinta rūšių genetinis vientisumas. Tuo pat metu akvakultūros sritis siekia įveikti šiuos iššūkius taikydama inovatyvius biotechnologinius sprendimus. Augant pasaulio priklausomybei nuo vandens išteklių, siekiant patenkinti maisto saugumo poreikius, pažangių veisimo technologijų, tokių kaip atrankinis veisimas, genominė atranka ir CRISPR/Cas9 genų redagavimas, integravimas atveria transformacines galimybes spręsti klimato kaitos ir tvarios akvakultūros iššūkius.

Šiame skyriuje detaliai nagrinėjama sudėtinga aplinkos pokyčių ir biotechnologijų pažangos sąveika akvakultūros sektoriuje. Pradžioje aptariama, kaip dėl pasaulinio atšilimo keičiasi vandens rūšių dauginimosi ciklai ir išgyvenimo dinamika, dėl to reikšmingai pakinta populiacijų struktūra ir ekosistemų funkcijos. Toliau dėmesys sutelkiamas į pažangius biotechnologinius sprendimus, pavyzdžiui, atrankinį veisimą ir genomikos atranką, kurie stiprina akvakultūroje auginamų rūšių atsparumą ir produktyvumą. Be to, pristatoma revoliucinė CRISPR/Cas9 genų redagavimo technologija, išryškinant jos pritaikymo galimybes gerinant žuvų rūšių atsparumą ligoms, augimo tempą ir gebėjimą prisitaikyti prie aplinkos pokyčių. Galiausiai aptariami šių technologijų etiniai, aplinkosauginiai ir reguliaciniai aspektai, akcentuojant būtinybę užtikrinti tvarią ir atsakingą inovacijų plėtrą akvakultūroje.

Šių diskusijų reikšmė yra didžiulė ir daro poveikį ne tik akvakultūros ateičiai, bet ir pasaulinėms pastangoms stabdyti biologinės įvairovės nykimą bei švelninti klimato kaitos poveikį. Ši įžanga parengia pagrindą išsamiai analizei apie iššūkius ir galimybes, atsiveriančias integruojant biotechnologijas į akvakultūros sritį pasaulinio atšilimo sąlygomis.

1. Klimato kaita ir vandens rūšių reprodukcija

1.1. Dauginimosi ciklų pokyčiai

Pasaulinis atšilimas, kurį lemia antropogeninė klimato kaita, daro didžiulį poveikį viso pasaulio ekosistemoms, įskaitant vandens aplinką. Viena iš svarbiausių sričių, kurias labiausiai veikia kylanti temperatūra, yra vandens rūšių dauginimasis. Dėl vandens temperatūros pokyčių keičiasi dauginimosi ciklai, neršto laikas, augimo tempai ir palikuonių išgyvenamumas, todėl keičiasi vandens populiacijų struktūra ir funkcionavimas. Šioje literatūros apžvalgoje siekiama išsiaiškinti, kaip šie aplinkos pokyčiai veikia vandens rūšis, daugiausia dėmesio skiriant dauginimosi ciklų pokyčiams ir genetiniam prisitaikymui.

Dauginimosi ciklų pokyčiai. Dėl pasaulinio atšilimo kylanti vandens temperatūra yra vienas iš pagrindinių veiksnių, lemiančių vandens rūšių reprodukcinės elgsenos pokyčius. Daugelio rūšių dauginimasis priklauso nuo specifinių temperatūros signalų. Didėjant



temperatūrai, pasikeitė dauginimosi įvykių laikas, o šie pokyčiai gali lemti rūšių ir jų buveinių neatitikimą.

Dauginimosi laikas. Tyrimai parodė, kad daugelis vandens gyvūnų rūšių dėl šiltesnės vandens temperatūros pradeda daugintis anksčiau. Pavyzdžiui, pastebėta, kad tokios žuvų rūšys kaip atlantinė menkė (*Gadus morhua*) ir europinis ešeris (*Perca fluviatilis*), reaguodamos į aukštesnę vandens temperatūrą, neršia anksčiau (Tompkins et al., 2017). Nors ankstyvesnis nerštas iš pradžių gali atrodyti naudingas, dažnai dėl jo lervutės nesuderinamos su maisto išteklių prieinamumu, nes fitoplanktono, kuris yra pagrindinis daugelio žuvų jauniklių maisto šaltinis, tuo pačiu metu gali nebūti (Durant et al., 2007). Dėl to gali sumažėti palikuonių išgyvenamumas, o tai dar labiau paveikia populiacijos dinamiką. Be to, ankstyvesnis nerštas nebūtinai garantuoja sėkmę, nes rūšys gali neršti anksčiau, nei susidaro optimalios sąlygos lervutėms išgyventi. Dėl laiko neatitikimo gali sumažėti gyvybingų palikuonių skaičius, o tai gali lemti ilgalaikį populiacijos mažėjimą (O'Reilly et al., 2008).

Augimo greitis ir metabolinis poveikis. Vandens temperatūros kilimas taip pat turi įtakos vandens rūšių medžiagų apykaitos greičiui. Dėl aukštesnės temperatūros paprastai paspartėja daugelio rūšių augimas, nes pagreitėja medžiagų apykaitos procesai (Angilletta et al., 2004). Tačiau šis augimo greičio padidėjimas ne visada gali būti naudingas. Per greitai šiltesniuose vandenyse augančios rūšys gali neišsivystyti reikiamo dydžio ar stiprumo, kad išgyventų iki brandos, todėl gali atsirasti silpnesnių individų, turinčių mažiau galimybių sėkmingai daugintis (Heath et al., 2014). Be to, greitesnis augimas ne visada susijęs su reprodukcinės sėkmės padidėjimu, nes rūšys gali susidurti su vystymosi etapų ir aplinkos sąlygų neatitikimu laikui.

Lervų išgyvenamumas. Ankstyvosios vandens rūšių gyvenimo stadijos dažnai yra labiausiai pažeidžiamos aplinkos pokyčių, o dėl kylančios vandens temperatūros gali dar labiau padidėti šis pažeidžiamumas. Dėl pakilusios temperatūros gali sumažėti deguonies kiekis vandenyje ir paveikti lervų, kurioms tinkamai vystytis reikalinga didelė deguonies koncentracija, išgyvenamumą (Pörtner et al., 2014). Be to, aukštesnė temperatūra gali kelti stresą organizmų jaunikliams, todėl jie bus mažiau pajėgūs susidoroti su kitais aplinkos iššūkiais, tokiais kaip plėšrūnai ar maisto trūkumas (Walther et al., 2002).

1.2. Genetinis prisitaikymas prie klimato kaitos

Nors aplinkos pokyčiai kelia sunkumų vandens rūšims, kai kurios jų gali genetiškai prisitaikyti prie besikeičiančių sąlygų. Genetinis prisitaikymas – tai populiacijų genetinės sudėties pokyčiai, kurie laikui bėgant leidžia rūšims susidoroti su aplinkos veiksniais, įskaitant aukštesnę temperatūrą.

Prisitaikymas prie temperatūros pokyčių. Tyrimai rodo, kad tam tikros rūšys tam tikru laipsniu genetiškai prisitaiko prie kylančios temperatūros. Pavyzdžiui, atlikus atlantinės menkės tyrimus, nustatyta vietinio prisitaikymo prie skirtingų temperatūrinių sąlygų skirtingose geografinėse vietovėse įrodymų (Jorgensen et al., 2017). Kai kurios šiltesniuose



vandenyse gyvenančios menkių populiacijos išvystė genetinių savybių, leidžiančių joms sėkmingai neršti esant aukštesnei temperatūrai. Panašiai kai kurių žuvų rūšių dauginimosi laiko ar fiziologinės tolerancijos pokyčiai gali pasireikšti per kelias kartas prisitaikant prie šiltesnės aplinkos (Lynch et al., 2014).

Tačiau rūšių gebėjimą genetiškai prisitaikyti riboja tokie veiksniai kaip genetinė įvairovė ir aplinkos pokyčių greitis. Rūšims, kurių genetinė įvairovė maža, arba rūšims, gyvenančioms sparčiai šiltėjančiose buveinėse, gali būti sunku gana greitai prisitaikyti, kad išvengtų populiacijos mažėjimo (Fischer et al., 2014). Be to, genetinio prisitaikymo procesas yra lėtas, o klimato šiltėjimo tempas gali viršyti kai kurių rūšių gebėjimą laiku prisitaikyti.

Sumažėjusi reprodukcinė sėkmė ir populiacijos mažėjimas. Kai kurios rūšys gali sėkmingai prisitaikyti prie kylančios temperatūros, tačiau kitos susiduria su sunkumais, dėl kurių sumažėja jų reprodukcinė sėkmė arba populiacija. Pavyzdžiui, rūšims, kurioms keliami specialūs dauginimosi reikalavimai – kurių nerštas priklauso nuo labai specifinio temperatūros diapazono – gali būti sunku susidoroti su greitais temperatūros pokyčiais, kuriuos sukelia pasaulinis atšilimas (Parmesan, 2006). Tokiais atvejais reprodukcinė sėkmė gali sumažėti, o populiacijos sumažėti arba net išnykti.

Rūšys, kurios genetiškai neprisitaiko prie kylančios temperatūros, gali nesugebėti sėkmingai daugintis savo natūraliose buveinėse, todėl sumažėja genetinė įvairovė ir dar labiau – jų galimybės išlikti klimato kaitos sąlygomis (Chevin et al., 2010).

Pasaulinio atšilimo poveikis vandens rūšių dauginimuisi yra įvairiapusis, apima dauginimosi ciklą pokyčius, augimo tempo kitimą ir palikuonių išgyvenamumo sumažėjimą. Dėl kylančios temperatūros daugelis žuvų rūšių neršia anksčiau, tačiau dėl to gali sutrikti maisto prieinamumas ir optimalios aplinkos sąlygos, todėl lervų išgyvenamumas mažėja. Nors kai kurios rūšys gali genetiškai prisitaikyti prie besikeičiančios temperatūros, aplinkos pokyčių greitis gali viršyti jų gebėjimą tai padaryti, todėl gali sumažėti reprodukcinė sėkmė ir populiacijos gausumas. Siekiant suprasti ilgalaikes šių pokyčių pasekmes vandens ekosistemoms ir parengti strategijas, kaip sušvelninti klimato kaitos poveikį šioms rūšims, būtina atlikti tolesnius tyrimus.

2. Pažangūs veislininkystės metodai

2.1. Selekcinis veisimas

Akvakultūra – sparčiai augantis sektorius, svariai prisidedantis prie pasaulinio maisto saugumo užtikrinimo. Klimatui ir toliau kintant, akvakultūros veikla susiduria su vis didesniais iššūkiais, tokiais kaip kylanti vandens temperatūra ir dažnėjantys ekstremalūs orų reiškiniai. Siekiant spręsti šiuos iššūkius, vis plačiau taikomi biotechnologiniai pasiekimai, ypač selekcinio veisimo ir genominės atrankos srityse, bandant išvesti akvakultūros rūšis, atsparesnes su klimatu susijusiam stresui.



Selekcinis veisimas jau kelis dešimtmečius yra akvakultūros pagrindas, leidžiantis didinti auginamų rūšių produktyvumą ir atsparumą. Šis procesas grindžiamas individų, pasižyminčių pageidaujamomis savybėmis, reprodukcijos atranka, taip palaipsniui gerinant populiacijos genetinę sudėtį. Tradiciškai selekcinis veisimas buvo orientuotas į tokius požymius kaip augimo greitis, atsparumas ligoms ir pašarų konversijos efektyvumas. Dėl klimato kaitos stiprėjant aplinkos streso veiksniams, vis daugiau dėmesio skiriama savybių, užtikrinančių atsparumą padidėjusiai vandens temperatūrai ir kitiems klimato iššūkiams, atrankai.

Tyrimai rodo, kad selekcinis veisimas gali padėti akvakultūros rūšims – tiek žuvims, tiek vėžiagyviams – prisitaikyti prie šiltesnių aplinkos sąlygų. Pavyzdžiui, tyrimai su atlantinėmis lašišomis parodė, kad taikant selektinę veisimą gali padidėti šių žuvų atsparumas karščiui, todėl išvestos populiacijos gali išgyventi šiltesniuose vandenyse, susidarančiuose dėl klimato kaitos (Gjøen et al., 2018). Be to, selekcinio veisimo programos vis dažniau orientuojamos į tokius požymius kaip atsparumas ligoms ir gebėjimas išgyventi hipoksiniomis (deguonies stygiaus) sąlygomis, kurios, esant aukštesnei temperatūrai, tampa vis dažnesnės (Houston et al., 2018).

Selekcinis veisimas, orientuotas į atsparumo klimatui didinimą, taip pat apima elgsenos tobulinimą. Pavyzdžiui, žuvis, kurios geriau toleruoja stresą, susijusį su tankiu populiacijos išsidėstymu ar žmogaus sąlyčiu, gali geriau prisitaikyti prie atšiauresnių sąlygų, kurias sukelia klimato kaita (Huntingford et al., 2020). Tokiomis veisimo programomis siekiama užtikrinti, kad akvakultūros rūšys išliktų gyvybingos kintančiomis klimato sąlygomis, taip prisidedant prie ilgalaikio sektoriaus tvarumo.

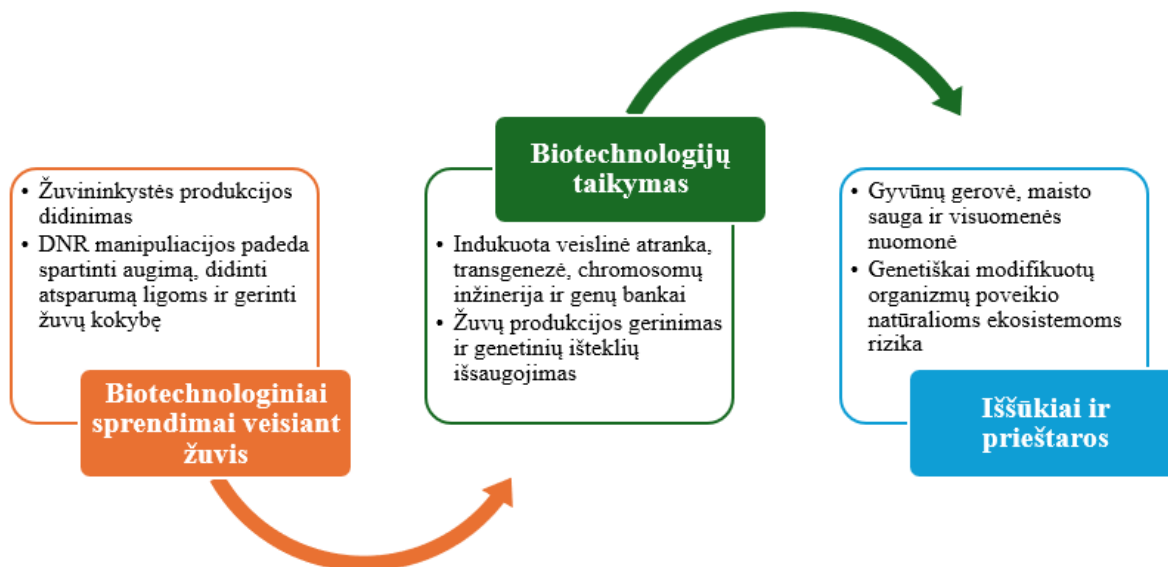
2.2. Genominė atranka

Šiuolaikinių biotechnologijų naudojimas vandens organizmų produktyvumui didinti turi didžiulį potencialą ne tik patenkinti augančią paklausą, bet ir pagerinti akvakultūros sektoriaus efektyvumą. Genetinė modifikacija ir biotechnologijos atveria dideles galimybes gerinti akvakultūroje auginamų žuvų kokybę ir kiekį. Atsižvelgiant į augančią akvakultūros produktų paklausą, biotechnologijos gali padėti patenkinti šį poreikį. Kaip ir visi biotechnologijomis patobulinti maisto produktai, akvakultūros produkcija bus griežtai reglamentuojama prieš tiekiant į rinką.

Be to, biotechnologijos taikymas akvakultūroje gali turėti ir aplinkosaugos pranašumų. Kai biotechnologijos tinkamai integruojamos su kitomis maisto, žemės ūkio produktų ir paslaugų gamybos technologijomis, jos gali reikšmingai prisidėti prie augančios ir vis labiau urbanizuotos visuomenės poreikių tenkinimo ateinančius dešimtmečius. Tačiau sėkmingas biotechnologijų vystymas ir taikymas įmanomas tik esant tvirtam tyrimų ir žinių pagrindui, apimančiam biologiją, genetinę įvairovę, veisimą, agronomiją, fiziologiją, patologiją, biochemiją ir genetiką. Naujųjų technologijų teikiama nauda negali būti pasiekta be nuolatinio



įsipareigojimo fundamentiniams tyrimams. Biotechnologinės programos turi būti visapusiškai integruotos į mokslinį kontekstą (3.1 pav.) – jų sėkmė neįmanoma atskirai nuo tyrimų bazės.



3.1 pav. Biotechnologijų vaidmuo didinant žuvininkystės produkciją (Yang et al., 2021)

Be atsparumo karščiui, genominė atranka taip pat taikoma kitoms su klimatu susijusioms savybėms, tokioms kaip atsparumas ligoms ir gebėjimas išgyventi mažo deguonies kiekio aplinkoje, gerinti. Pavyzdžiui, genominiai įrankiai naudojami siekiant identifikuoti genetinius žymenis, susijusius su atsparumu patogenui *Vibrio anguillarum*, kuris kelia rimtą grėsmę akvakultūros rūšims šiltesniuose vandenyse (Vázquez et al., 2018). Naudojant genominius metodus veisti žuvis, atsparesnes ligoms, galima padidinti akvakultūros sistemų tvarumą ir sumažinti priklausomybę nuo antibiotikų, kurių naudojimas vis labiau kelia susirūpinimą dėl poveikio aplinkai.

Genominė atranka taip pat integruojama su tradiciniu selekciniu veisimu, siekiant maksimaliai padidinti genetinę pažangą. Genominės informacijos derinimas su fenotipiniais duomenimis leidžia veisėjams priimti labiau pagrįstus sprendimus dėl reprodukcijai tinkamų individų. Pavyzdžiui, pasitelkus genominius duomenis galima prognozuoti būsimą palikuonių produktyvumą, taip išvengiant įvaisos (giminingo kryžminimo) ir užtikrinant ilgalaikę akvakultūros populiacijų genetinę sveikatą (Gjøen et al., 2018).

Selekcinio veisimo ir genominės atrankos integravimas. Selekcinio veisimo ir genominės atrankos integravimas laikomas galinga strategija, užtikrinančia akvakultūros rūšių atsparumą klimato kaitos sąlygomis. Selekcinis veisimas sukuria tvirtą pagrindą gerinant tokias savybes kaip augimo greitis ar atsparumas ligoms, o genominė atranka pagreitina procesą ir padidina veisimo programų tikslumą. Abi technologijos leidžia greičiau sukurti veisles, labiau prisitaikančias prie kintančių aplinkos sąlygų. Pavyzdžiui, atlantinių lašišų atveju buvo taikomas tiek selekcinis veisimas, tiek genominė atranka, siekiant išvesti veisles, atsparesnes



aukštesnėms temperatūroms ir ligoms (Gjøen et al., 2018). Derinant šiuo du metodus galima reikšmingai padidinti akvakultūros tvarumą, kuriant veisles, galinčias klestėti šiltesnėmis ir labiau kintančiomis aplinkos sąlygomis.

Iššūkiai ir ateities kryptys. Nors biotechnologinė pažanga suteikia daug vilčių dėl akvakultūros veisimo tobulinimo, egzistuoja ir tam tikri iššūkiai. Vienas svarbiausių rūpesčių – galimas genetinis homogenizavimas fermose auginamose populiacijose, kuris gali lemti įvairių ir sumažėjusių genetinę įvairovę. Todėl būtina, kad veisimo programomis būtų efektyviai valdoma genetinė įvairovė ir užtikrinama, kad akvakultūros rūšys išliktų prisitaikančios prie būsimos aplinkos kaitos (Houston et al., 2018). Be to, genominei atrankai įgyvendinti reikia reikšmingų investicijų į genominius išteklius, įskaitant aukštos kokybės etaloninių genomų ir genetinių žymenų kūrimą. Nors pastaraisiais metais šie įrankiai tapo prieinamesni, jų kaina ir sudėtingumas tebėra kliūtis kai kurioms akvakultūros šakoms (Huntingford et al., 2020). Nepaisant šių iššūkių, nuolatinė genominių technologijų raida, derinama su skaitmeninių įrankių ir veisimo strategijų pažanga, teikia daug vilčių, siekiant padidinti akvakultūros rūšių atsparumą klimato kaitai.

Išvados. Biotechnologinė pažanga, taikoma veisiant akvakultūrą, įskaitant selekcinį veisimą ir genominę atranką, siūlo daug žadančių sprendimus klimato kaitos keliamų iššūkių akivaizdoje. Naudojant šias technologijas, galima padidinti rūšių atsparumą kylančiai temperatūrai, ligoms ir kitiems aplinkos stresoriams. Tai gali padėti užtikrinti sektoriaus tvarumą. Genominės atrankos integravimas su tradiciniais veisimo metodais, tikėtina, taps svarbia strategija, siekiant vystyti klimato kaitai atsparesnes žuvų ir vėžiagyvių veisles. Kadangi akvakultūros sektorius ir toliau patirs klimato kaitos spaudimą, šios biotechnologinės inovacijos atliks esminį vaidmenį užtikrinant, kad akvakultūra išliktų gyvybingas ir tvarus maisto šaltinis pasaulio gyventojams.

3. Genų inžinerija ir CRISPR

3.1. Genų inžinerija akvakultūroje

Biotechnologinių metodų taikymas siekiant pagerinti auginamų organizmų gerovę, padidinti produktyvumą ir apsaugoti vandens ekosistemas jau davė vilčių teikiančių rezultatų. Tarp jų – vakcinos ir imunostimuliatoriai, probiotikai, prebiotikai, simbiotikai, paraprobiotikai, gydymas bakteriofagais, antimikrobiniai peptidai, genų terapija, RNR interferencija bei kiti biotechnologiniai gydymo būdai. Genetinė pažanga akvakultūroje atlieka svarbų vaidmenį didinant produktyvumą, mažinant gamybos sąnaudas ir neigiamą poveikį aplinkai.

Žuvų genomui keisti naudojami tokie metodai kaip CRISPR-Cas9, į transkripcijos aktyvatorių panašios efektorinės nukleazės ir cinko pirštų nukleazės. Taip pat taikoma molekulinė biologija, transgenezė, genų bankininkystė, chromosomų manipuliacijos, gydymas hormonais, žuvų auginimas su vienu ar daugiau tėvų, žuvų su skirtingu ląstelių rinkiniu (poliploidinių, triploidinių, haploidinių, gineogenetinių ir androgenetinių) kūrimas bei



sintetinių hormonų naudojimas dauginimuisi skatinti. Visi šie metodai sudaro svarbią žuvų biotechnologijos dalį.

Biotechnologijų naujovės sukėlė proveržį žuvų genetiniame veisime ir paskatino reikšmingą pažangą visoje akvakultūros pramonėje (Yang et al., 2021). Tokie metodai kaip genų inžinerija ir CRISPR-Cas9 leido tiksliai modifikuoti žuvų genomus, todėl išvystytos veislės pasižymi spartesniu augimu, didesniu atsparumu ligoms ir efektyvesniu pašarų naudojimu. Selekcinės veisimo programos buvo patobulintos taikant žymenimis paremtą atranką, kuri leidžia tiksliau identifikuoti ir dauginti pageidaujamas genetines savybes. Be to, reprodukcinės technologijos, tokios kaip hormonų stimuliuojamas nerštas ir lytinių ląstelių kriokonservavimas, leido padidinti veisimo sėkmės rodiklius ir išsaugoti genetinę įvairovę.

Šie pasiekimai prisidėjo prie tvaresnės ir produktyvesnės žuvų auginimo praktikos kūrimo, padedančios atliepti didėjančią pasaulinę jūrų gėrybių paklausą. Šios priemonės ypač reikšmingos siekiant išsaugoti nykstančias žuvų rūšis ir pagerinti komercinės žuvininkystės rezultatus. Prie šios pažangos taip pat prisideda tokie metodai kaip sintetinių hormonų naudojimas, vienos lyties (monoseksinių) populiacijų kūrimas ir transgenezė. Įvairios biotechnologinės inovacijos žuvų veisimo srityje pavaizduotos 3.2 paveiksle (Sankaran & Mandal, 2024).



3.2 pav. Biotechnologinės inovacijos žuvų veisimo srityje

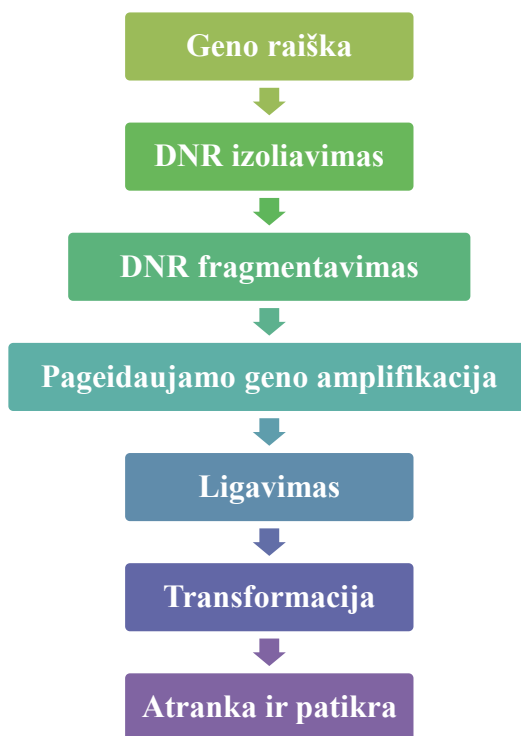
Genetinė įvairovė yra svarbus išteklius, kurį galima panaudoti selekcinio veisimo programoms. Tokios programos pripažintos kaip efektyvios priemonės, reikšmingai



pagerinančios akvakultūros sektoriaus veiklos rezultatus. Mokymų ir technologijų perdavimas tarp skirtingų akvakultūros šakų gali turėti didelės naudos mažesnės vertės rūšims, didinant jų produktyvumą ir tvarumą.

Organizmo genomas gali būti modifikuojamas įterpiant sintetinę DNR, sukurta iš įvairių šaltinių, taikant vadinamąją rekombinantinės DNR technologiją. Pirmasis šios procedūros žingsnis – norimo geno turinčio genetinio fragmento įterpimas į esamą genomą. Šioje technologijoje naudojami tokie įrankiai kaip restrikciniai fermentai, vektoriai ir ląstelių šeimininkai. Į procesus, susijusius su DNR karpymu, sinteze ir sujungimu, įtraukiama įvairių fermentų. Šių fermentų grupei priskiriami, pavyzdžiui, restrikciniai endonukleazės fermentai. Vektoriai yra svarbūs norimiems genams pernešti ir įterpti į tikslinį organizmą.

Rekombinantinės DNR technologija taikoma genų klonavimo, genų terapijos ir žemės ūkio srityse. 3.3 paveiksle pavaizduoti pagrindiniai šios technologijos etapai (Sankaran & Mandal, 2024).



3.3 pav. Pagrindiniai rekombinantinės DNR technologijos etapai (Sankaran & Mandal, 2024)

3.2. CRISPR metodo galimybės

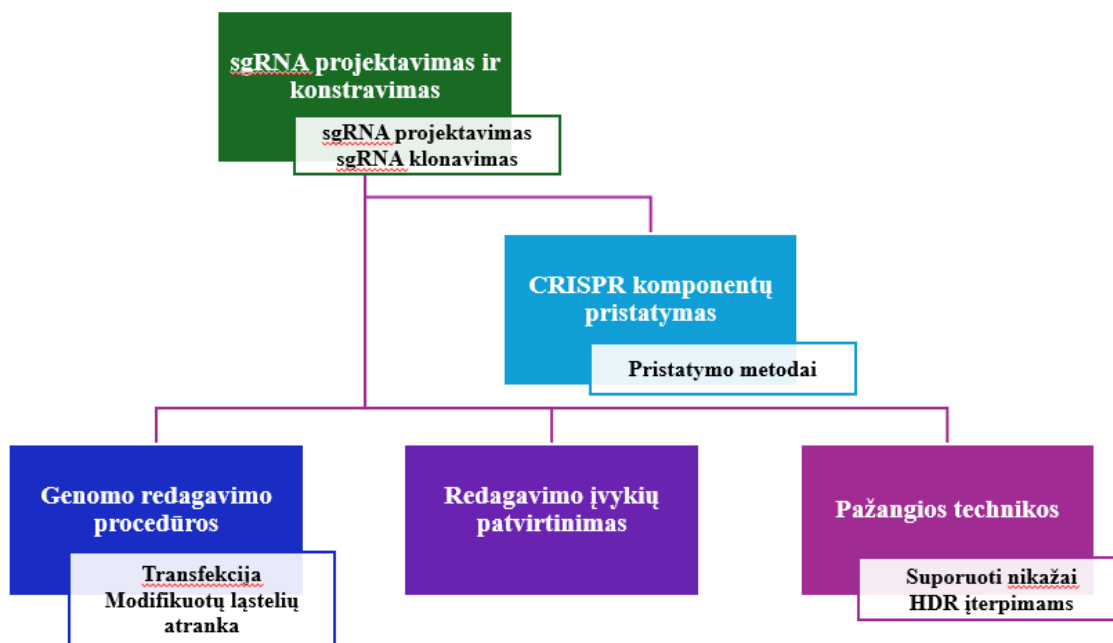
CRISPR/Cas9 – revoliucinis genetinės inžinerijos įrankis, leidžiantis tiksliai ir kryptingai modifikuoti žuvų DNR, siekiant pagerinti tokias savybes kaip pigmentacija, augimas, raumenų kokybė ir atsparumas ligoms. Ši technologija pranoksta tradicinius veisimo metodus, nes pasižymi mažesnėmis sąnaudomis, paprastesniu taikymu ir didesniu tikslumu. Ji plačiai taikoma siekiant pagerinti augimo rodiklius (pavyzdžiui, kūno masę, ilgį, raumenų vystymąsi), raumenų kokybę, ligų atsparumą bei lyties nustatymą. Be to, CRISPR/Cas9 siūlo



perspektyvius sprendimus stiprinant atsparumą ligoms, taikant į genus, susijusius su imunitetu, ir patogenų atpažinimo mechanizmus, taip sumažinant antibiotikų ir cheminių medžiagų poreikį.

Ši technologija reikšmingai paspartino akvakultūros plėtrą, leido genetiškai optimizuoti svarbiausias žuvų rūšių savybes. Pavyzdžiui, mokslininkams pavyko sėkmingai manipuluoti lytinėmis ląstelėmis atlantinėse lašišose, siekiant kontroliuoti jų dauginimosi diferenciaciją, pagerinti pašarų konversijos efektyvumą augimui geltonuosiuose šamukuose, atlikti tikslingą genų modifikaciją tilapijose bei sumažinti nepageidaujamus „off-target“ efektus (Zhu et al., 2024).

3.4 paveiksle pavaizduoti pagrindiniai CRISPR/Cas9 metodo etapai redaguojant genus. Ši sistema susideda iš dviejų pagrindinių komponentų – Cas9 fermento ir vadinamosios gido RNR. CRISPR–Cas9 pagrindas – supaprastinta bakterijose aptikta antivirusinės gynybos sistema. *In vivo* genų redagavimas įmanomas į ląstelę įterpian sintetinės gido RNR (gRNA) kompleksą kartu su Cas9 nukleaze, kuris perkerpa genomą tiksliai nurodytoje vietoje. Šis metodas ypač svarbus biotechnologijoje ir medicinoje dėl galimybės lengvai, tiksliai ir nebrangiai redaguoti genus gyvame organizme.



3.4 pav. CRISPR/Cas9 genų redagavimas (Sankaran & Mandal, 2024)

Be taikymo valdant ligas ir kenkėjus, ši technologija turi potencialo kuriant naujus žemės ūkio produktus, genetiškai modifikuotus organizmus bei farmacijos produkciją. Ji taip pat naudinga gydant paveldimas ligas ir somatinių mutacijų sukeltas būklės, įskaitant vėžį. CRISPR/Cas9 siūlo paprastą, RNR valdomą metodą tiksliai DNR pokyčiams sukelti konkrečiose vietose. Tokie DNR pakeitimai gali sukelti aiškiai pastebimus fenotipinius pasireiškimus, pavyzdžiui, akių spalvos pokyčius ar jautrumą tam tikroms ligoms. Sistema



veikia pasitelkdama RNR molekules, kurios atitinka taikinius DNR sekose, kartu su Cas9 fermentu, atliekančiu perkirpimo funkciją.

Nors CRISPR/Cas9 gali sukelti revoliuciją genų inžinerijos srityje, ji turi ir trūkumų. Didelį susirūpinimą kelia genomo redagavimo tikslumas, nes dėl jo genomas nuolat keičiasi. Be to, jo naudojimas žmogaus lytinės linijos genetiniam modifikavimui yra labai prieštaringas. Apskritai CRISPR/Cas9 genų redagavimas gali sukelti revoliuciją biotechnologijų ir medicinos srityse. Tačiau labai svarbu būti apdairiems ir apsvarstyti su jo taikymu susijusias etines pasekmes (Sankaran & Mandal, 2024).

3.2.1. Atsparumas ligoms

Atsparumas ligoms yra labai svarbus akvakultūros bruožas, rodantis rūšies gebėjimą atsisirti infekcijoms, blogai vandens kokybei ir aplinkos pokyčiams. CRISPR/Cas9 tarpininkaujamas genomo redagavimas tapo galingu metodu šiam atsparumui didinti. Integruojant antimikrobinių peptidų genus (AMG) į žuvų genomus, CRISPR/Cas9 sumažina bakterijų kolonizaciją, padidina išgyvenamumą po infekcijos ir pakeičia su imunitetu susijusių genų raišką. Šis tikslus redagavimas leido pasiekti reikšmingų laimėjimų, pavyzdžiui, padidinti lašišų atsparumą infekcinei pankreatinei nekrozei (IPN) ir bakterinei šaltųjų vandenų ligai, taip pat nukreipti JAM-A geną, kad būtų užblokuotas viruso patekimas į karpių organizmą ir taip suteiktas imunitetas karpių reovirusui (GCRV).

Tilapijų atveju CRISPR/Cas9 redagavo genus, susijusius su imuninėmis reakcijomis, ir padidino atsparumą tokiems bakteriniams patogenams kaip *Streptococcus agalactiae* ir *Aeromonas hydrophila*. Panašiai ši technologija buvo pritaikyta ir šamų imunitetą reguliuojantiems genams, taip padidinant išgyvenamumą po patogenų poveikio. Šiuos pasiekimus papildė „knock-in“ metodai, kuriais įdiegiami svetimi genai, didinantys atsparumą ligoms ir kartu gerinantys tokių rūšių kaip tilapijos ir šamai augimą ir maistinę vertę (Zhu et al., 2024).

3.2.2. Žuvų augimas ir raumenų kokybė

CRISPR/Cas9 padėjo pagerinti akvakultūros rūšių, įskaitant nilinę tilapiją, kanalinių šamą, paprastąjį karpį ir vaivorykštinį upėtakį, augimo tempus ir raumenų kokybę. Tikslinant tokius su augimo hormonais susijusius genus kaip *miostatinas* (*mstn*), kuris stabdo raumenų augimą, mokslininkams pavyko gerokai padidinti kūno masę ir raumenų vystymąsi. Pavyzdžiui, kanalinių šamų, kurių *mstn* genai buvo pažeisti, kūno masė padidėjo 29,7 proc., o panašiai modifikuoti alyvuogių plekšnių ir raudonųjų jūrinių šamų raumenys padidėjo ir optimizuotas komercinis žuvų dydis.

Be augimo, CRISPR/Cas9 leidžia tirti vystymosi procesus ir žmogaus ligų modelius naudojant danijas (*Danio rerio*) – plačiai genetiniams tyrimams naudojamą organizmą. Transgeniniais metodais buvo dar labiau patobulintas žuvų auginimas, nes tokiose rūšyse kaip atlantinė lašiša buvo pernelyg stipriai išreikšti augimo hormono genai, taip pasiektas spartus augimas ir didesnis derlius, kad būtų patenkinta pasaulinė baltymų paklausa. Šios genetinės

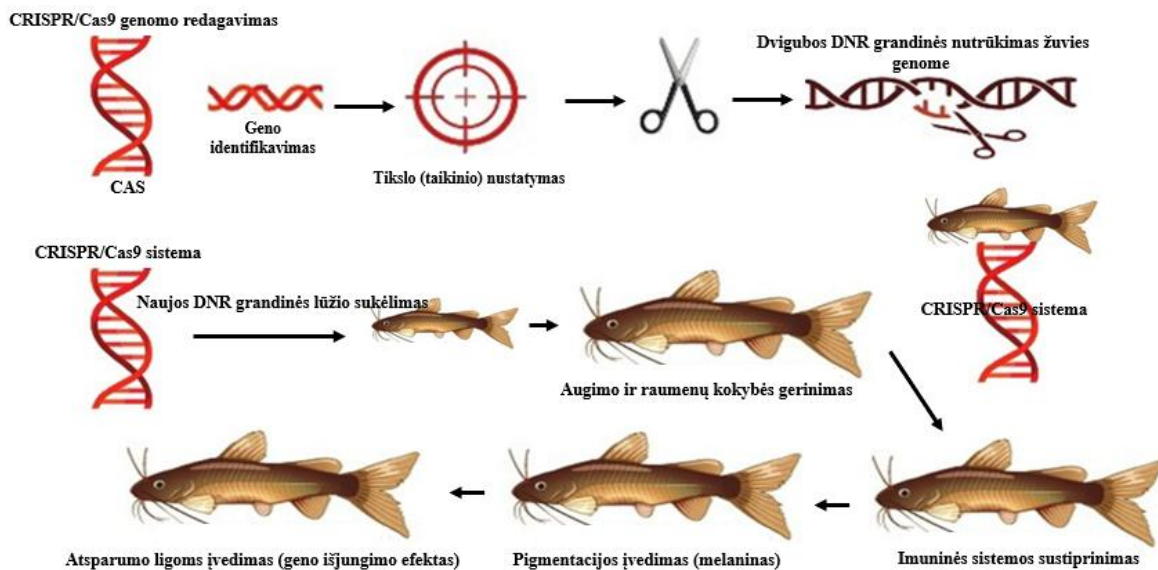


modifikacijos kartu su optimizuota mityba ir selektyviu veisimu pagerina raumenų struktūrą ir bendrą akvakultūros efektyvumą (Zhu et al., 2024).

3.2.3. CRISPR/Cas9 nepageidaujami („off-target“) poveikiai

Nors CRISPR/Cas9 pasižymi neprilygstamu tikslumu, vis dar kyla problemų dėl nepageidaujamo poveikio. Tokie nenumatyti DNR pokyčiai gali paveikti kitas genomo vietas ir sukelti nepageidaujamų pasekmių. Naujausi patobulinimai, įskaitant didelio tikslumo Cas9 variantus (pavyzdžiui, SpCas9-HF1, eSpCas9), žymiai sumažino šių klaidų tikimybę. Patobulintas vedančiosios RNR (gRNA) dizainas ir tokie algoritmai kaip CRISPR-DO padidino specifiškumą. Be to, tokie naujos kartos įrankiai kaip bazių ir pirminių grandžių redaktoriai leidžia tiksliai modifikuoti genomą, nesukeliant dvigubų grandinių lūžių, todėl sumažėja netikslinių mutacijų. Pažangios genų pernašos sistemos, įskaitant nanodaleles ir virusinius vektorius, padidina redagavimo tikslumą.

Danijoms ir kitoms akvakultūros rūšims, įskaitant tilapijas ir atlantines lašišas, šie pasiekimai sėkmingai taikomi. Didelio tikslumo redagavimas leido mokslininkams padidinti augimą, atsparumą ligoms ir kitas savybes išlaikant genomo vientisumą. CRISPR/Cas9 mechanizmas, naudojamas įvairių žuvų rūšių genams išjungti, pateikiamas 3.5 paveiksle.



3.5 pav. CRISPR/Cas9 taikymo akvakultūroje etapai (pirmiausia sukuriamą specifinę gRNA, atitinkanti tikslinio geno seką. Tada Cas9 baltymas prisijungia prie tikslinės DNR ir sukelia dvigubos grandinės lūžį. Galiausiai lūžis pataisomas) (Zhu et al., 2024)

3.2.4. Lyties nulėmimas

Žuvų lyties nulėmimas susijęs su genetiniais, aplinkos ir epigenetiniais veiksniais, todėl tai yra sudėtinga, bet gyvybiškai svarbi akvakultūros tyrimų sritis. CRISPR/Cas9 technologija padėjo atskleisti lyties diferenciacijos mechanizmus, leido tiksliai taikytis į su tuo susijusius genus. Pavyzdžiui, redaguojant Nilo tilapijos *amh* geną, iš genetinių patinų buvo išvystytos fenotipiškai moteriškos lyties žuvis, kas parodė šio geno reikšmę vyriškos lyties nulėmimui.



Panašūs danių tyrimai buvo atliekami taikantis į *dmrt1* ir *sox9a* genus, atskleidžiant šios rūšies lyties nulėmimo poligeninį pobūdį. Be to, viso genomo CRISPR/Cas9 taikymai padėjo identifikuoti pagrindinius reguliatorius, tokius kaip *sdY* genas vaivorykštinuose upėtakiuose, taip dar labiau praplečiant mūsų supratimą apie lyties diferenciacijos procesus.

3.2.5. CRISPR/Cas9 naudojimo genams redaguoti poveikis skirtingoms žuvų rūšims

CRISPR/Cas9 technologija padeda spręsti daugelį akvakultūros iššūkių, tokių kaip ligų protrūkiai, lėtas augimo tempas ir aplinkos degradacija. Ši technologija taip pat pritaikoma invazinių rūšių kontrolei, genetiškai modifikuotiems mikroorganizmams kurti aplinkai valyti ir genetiškai modifikuotoms žuvims vystyti, siekiant tvarios gamybos. Genomo redagavimas suteikia galimybę pagerinti žuvų savybes, kartu mažinant akvakultūros poveikį aplinkai. Pavyzdžiui, transgeninės žuvis, pasižymintys geresniu pašarų konversijos efektyvumu, padeda sumažinti resursų sunaudojimą ir skatina aplinkai draugišką žuvininkystę.

Tiksliai atliekami genetiniai pakeitimai iš esmės pakeitė žuvų auginimo praktiką, atsirado sąlygos efektyvesnei ir tvaresnei akvakultūros plėtrai. Tobulėjant redagavimo metodams, kartu atsižvelgiant į etinius ir aplinkosaugos aspektus, bus galima dar tikslingiau ir atsakingiau taikyti šią technologiją. 3.1 lentelėje pateikiama dažniausiai genomo redagavimu taikomų žuvų savybių santrauka (Blix et al., 2021).

3.1 lentelė. CRISPR/Cas9 poveikis žuvų rūšių biologiniams ir aplinkos aspektams

Taikymo sritis	Poveikis
Atsparumas ligoms	Sumažina azijinės paltusžuvis natūralių embrionų (HINAE) ląstelių užsikrėtimą virusiniu hemoraginiu septicemijos virusu (VHSV)
	Leidžia redaguoti tokių rūšių kaip lašiša, tilapija ir krevetės genus, siekiant padidinti jų atsparumą ligoms
	Padedą iš baltųjų amūrų ląstelių pašalinti JAM-A geną, taip reikšmingai padidinant atsparumą reovirusui (GCRV)
	Pagerina žuvų ląstelių linijų atsaką į infekcijas ir genetinį atsparumą, naudojant atlantinę lašišą ir vaivorykštinį upėtakį kaip modelines rūšis akvakultūroje
Prisitaikymas prie aplinkos	Padedą redaguoti žuvų rūšių, pavyzdžiui, ūkiuose auginamų lašišų, genus, susijusius su prisitaikymu prie kintančių aplinkos sąlygų
Augimo tempas ir raumenų masė	Didina raumenų augimą išjungiant melanokortino (<i>mc4r</i>) receptorių genus: eksperimentai atlikti su kanaliniu šamu ir japoninėmis medakomis
	Pagerina augimo tempą ir padidina kanalinių šamų raumenų masę, modifikuojant miostatino geną jų embrionuose
	Vuchanginio karšio (<i>Megalobrama amblycephala</i>) atveju dėl <i>mstna</i> geno sutrikdymo skatinamas raumenų masės augimas

CRISPR/Cas9 genų redagavimo technologija iš esmės pakeitė akvakultūrą, leido tiksliai modifikuoti genus, siekiant pagerinti tokias savybes kaip atsparumas ligoms, augimas ir tvarumas. Šis įrankis taip pat leidžia naudoti genų paveldimumą skatinančius metodus („gene



drives“), kurie beveik iki 100 proc. padidina modifikuotų genų paveldėjimo tikimybę, taip paspartindami pageidaujamų savybių paplitimą populiacijose.

Li ir kt. (2021) naudojo CRISPR/Cas9 technologiją steriliai, vien vyriškos lyties Nilo tilapių populiacijai sukurti, o tai lėmė spartesnį augimą ir sumažino ekologinę riziką, susijusią su į aplinką patekusiomis auginamomis žuvimis. Panašiai Wargelius ir kolegės padidino atlantinių lašišų atsparumą ligoms, modifikuodami virusinei infekcijai svarbius genus, spręsdami didelių akvakultūros nuostolių, kuriuos sukelia tokie patogenai kaip IPNV ir SAV, problemą.

Kituose tyrimuose CRISPR/Cas9 technologija buvo taikyta siekiant pagerinti karpių, tilapių ir šamų atsparumą ligoms, modifikuojant imuninės sistemos genus arba patogenų atpažinimo kelius. Su augimu susijusių genų redagavimas taip pat pateikė reikšmingų rezultatų, pavyzdžiui, karpių, kanalinių šamų ir raudonpelekių pagelų miostatino geno išjungimas, dėl kurio padidėjo kūno dydis ir augimo tempai.

CRISPR/Cas9 taikymas neapsiriboja tik produkcinėmis savybėmis – ši technologija leidžia kurti ir naujus fenotipus. Tarp pavyzdžių – albinosinės Nilo tilapijos bei modifikuoti Ramiojo vandenyno austrės individai, pasižymintys pagerėjusiu augimu. Šios technologijos universalumas pasireiškia ir kitų rūšių, pavyzdžiui, dryžauodegių rytinių krevečių, atveju, dar labiau išryškindamas jos transformuojantį potencialą akvakultūros srityje (3.2 lentelę).

3.2 lentelė. CRISPR/Cas9 taikymas įvairioms žuvų rūšims ir jų poveikis (Zhu et al., 2024)

Žuvų rūšys	Technologinis poveikis
<i>Nilo tilapija</i>	Naudojama sterilioms Nilo tilapių populiacijoms sukurti, taip sumažinant aplinkos pažeidimo riziką dėl į laisvę patekusių žuvų
<i>Atlantinė lašiša</i>	Padedą redaguoti genus, siekiant sukurti rūšis, itin atsparias virusinėms infekcijoms (pavyzdžiui, lašišoms)
<i>Danija</i>	Leidžia mokslininkams tirti mutacijas ir genetinius variantus Gali būti naudojama integruoti sudėtinius žymenis į embrionus, leidžiant tiksliai pažymėti ir vizualizuoti ląstelines struktūras ar baltymus. Tai atveria galimybes tirti baltymų dinamiką, genų raišką ir kitus biologinius procesus šiame modeliniame organizme
<i>Vaivorykštinis upėtakis</i>	Įrodyta, kad sumažina <i>igfbp-2b</i> geno raišką vaivorykštiniuose upėtakiuose, kas turi įtakos augimui ir vystymuisi, tačiau poveikis bendrai žuvų būklei ir endokrinei sistemai lieka neaiškus
<i>Atlantinė lašiša ir vaivorykštinis upėtakis</i>	Naudota tikslinei genų, susijusių su augimu ir imunitetu, modifikacijai atlantinių ir koho lašišų, vaivorykštinių upėtakių ląstelėse
<i>Japoninė medaka</i>	Gali pagerinti auginamų žuvų rūšių, tokioms kaip medaka, raumenų augimą ir padidinti kūno svorį. Tačiau reikia tolesnių tyrimų, norint nustatyti poveikį produkcijos derliui ir žuvų sveikatai
<i>Azijinė paltušuvė</i>	Gali būti naudojama miostatino genui sutrikdyti, siekiant padidinti kūno svorį ir raumenų masę, bet būtini tolesni tyrimai dėl efektyvumo ir poveikio žuvų sveikatai
<i>Baltoji katžuvė</i>	Naudota miostatino geno modifikacijai, siekiant pagerinti raumenų augimą ir kokybę, tačiau reikia daugiau tyrimų, kad būtų iki galo suprastas poveikis



4. Kriokonservavimas ir pagalbinis apvaisinimas

4.1. Ląstelių ir gametų kriokonservavimas

Žuvų veisimui įtakos turi įvairūs veiksniai, todėl net labiausiai patyrę inkubatorių operatoriai dažnai susiduria su dalinėmis arba visiškoms veisimo proceso nesėkmėmis. Siekiant užtikrinti reikiamą lervučių kiekį, dirbtinis veisimas laikomas veiksmingu metodu. Šis metodas palengvina žuvų brendimą ir nerštą nepalankiomis sąlygomis, pavyzdžiui, esant nepakankamam kritulių kiekiui arba ekstremaliems klimato scenarijams. Vis dėlto pakartotinis veisimas reikšmingai vargina veislės žuvis per jų ribotą gyvenimo trukmę. Veislinių žuvų pakeitimas yra sudėtingas dėl logistinių ir fiziologinių jų transportavimo problemų. Dėl to žuvų lytinių ląstelių (gametų) transportavimas iškilo kaip perspektyvi alternatyva, teikianti panašią naudą, kaip ir gyvulininkystėje.

Biotechnologinių priemonių taikymas žuvų veisimo programose yra būtinas siekiant užtikrinti nuoseklų ir tvarų jaunikių veisimą. Vienas iš veiksmingų sprendimų yra kriokonservavimas, leidžiantis išlaikyti aukštos kokybės lervutes ir genetiškai pranašesnes žuvų veisles. Maisto ir žemės ūkio organizacija (FAO) pripažino kriokonservavimą kaip svarbią žuvų genetinių išteklių išsaugojimo strategiją (Betsy et al., 2022).

Kriokonservavimas – tai biologinių mėginių išsaugojimas itin žemoje temperatūroje, visiškai sustabdant medžiagų apykaitą ir išlaikant struktūrinę bei funkcinę vientisumą neribotą laiką. Ši technologija tapo svarbia reprodukcinės biologijos dalimi ir suteikia akivaizdžios naudos tiek gyvulininkystės, tiek akvakultūros sektoriams. Esant temperatūrai žemiau -130°C , visi medžiagų apykaitos procesai visiškai sustoja, todėl biologiniai mėginiai – ląstelės, audiniai ar net visi organizmai – gali išlikti gyvybingi atšildžius. Kriokonservavimas ypač svarbus saugant vertingą genetinę medžiagą, tobulinant veisimo programas ir taikant biologinės įvairovės išsaugojimo iniciatyvas (Fletcher ir Rise, 2012).

Išsaugojimo mechanizmai

Kriokonservavimas leidžia ilgiau išsaugoti lytines ląsteles, dažnai kelerius metus, nedarant didelės įtakos jų gebėjimui apvaisinti. Sumažinus temperatūrą iki maždaug -196°C , sustabdoma visa biologinė ir biocheminė veikla, taip užkertant kelią procesams, kurie lemia ląstelių žūtį ir DNR irimą. Ši technologija yra itin svarbi priemonė ilgalaikiam akvakultūros tęstinumui ir biologinės įvairovės išsaugojimui užtikrinti.

Vis dėlto ledo kristalų susidarymas biologinėse sistemose lieka didelis iššūkis, kadangi gali sukelti mechaninių pažeidimų ir osmosinį disbalansą. Valdomo šaldymo metu ledas formuojasi už ląstelės ribų, sukuriant koncentracijos gradientą, kuris skatina vandens pašalinimą iš ląstelės vidaus. Taip išvengiama pavojingo ledo susidarymo ląstelės viduje. Pažanga kuriant krioprotektorius (apsauginius agentus nuo šalčio poveikio) buvo itin svarbi šiems pažeidimams mažinti ir sudarė sąlygas sėkmingai konservuoti įvairių tipų ląsteles, audinius ir smulkius biologinius darinius. Tobulinant šaldymo greičio, krioprotektorių



koncentracijos ir ląstelių savitų savybių sąveiką, mokslininkams pavyko žymiai pagerinti kriokonservavimo rezultatus.

Krioprotekcinės medžiagos

Krioprotektoriai atlieka esminį vaidmenį mažinant ledo kristalų susidarymą ląstelės viduje bei išsaugant baltymų ir membranų vientisumą užšaldymo ir atšildymo metu. Šios medžiagos skirstomos į dvi grupes: prasiskverbiantys ir neprasiskverbiantys. Prasiskverbiantys krioprotektoriai, tokie kaip DMSO, glicerolis ir metanolis, patenka į ląstelių vidų ir padeda subalansuoti osmosinį slėgį tarp vidinės ir išorinės ląstelės aplinkos. Neprasiskverbiantys krioprotektoriai, įskaitant tam tikrus cukrus ir baltymus, veikia daugiausia už ląstelės ribų – jie keičia tirpalo užšalimo temperatūrą ir suteikia papildomą apsaugą nuo šalčio poveikio. Nors krioprotektoriai teikia svarbių pranašumų, juos naudoti reikia atsargiai – netinkamai taikomi jie gali sukelti toksinį poveikį, osmosinį stresą ir chromosomų pažeidimus. Todėl viena svarbiausių dabartinių tyrimų kryptų yra apsauginių savybių ir galimų žalingų padarinių pusiausvyros nustatymas.

Šaldymo ir atšildymo protokolai

Kriokonservavimo sėkmė didele dalimi priklauso nuo tikslios šaldymo ir atšildymo protokolų kontrolės. Kontroliuojamas šaldymo greitis, kuris paprastai svyruoja nuo $-40^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ iki lėtesnių tempų, yra būtinas norint sumažinti ledo kristalų susidarymą. Siekiant užtikrinti šias kontroliuojamas sąlygas, plačiai taikomi specializuoti biologiniai šaldikliai ir azoto garų metodai. Tuo tarpu atšildymas turi būti greitas, kad būtų išvengta ledo rekristalizacijos – proceso, kuris gali smarkiai pažeisti ląstelines struktūras. Naujai diegiamomis technologijomis, tokiomis kaip programuojami šaldymo įrenginiai ir pažangūs atšildymo metodai, siekiama standartizuoti ir optimizuoti šiuos procesus skirtingoms biologinėms medžiagoms. Tokie sprendimai leidžia pagerinti ląstelių išgyvenamumą ir funkcinį atsistatymą (Fletcher & Rise, 2012).

4.1.1. Gametų kriokonservavimas

Spermos kriokonservavimas

Spermos kriokonservavimas yra viena sėkmingiausių kriobiologijos taikymo sričių. Gyvulininkystėje jau taikomi standartizuoti protokolai, o akvakultūroje šios technologijos naudojimas vis labiau plečiasi. Tačiau žuvų sperma gerokai skiriasi nuo žinduolių, todėl reikalingi specifiniai metodiniai sprendimai. Pagrindinės žuvų spermos savybės apima jos nejudrumą sėkliniame plazmos skystyje, judrumo aktyvavimą patekus į aktyvinančius tirpalus, didelį jautrumą osmosiniams pokyčiams bei santykinai mažą ATP kiekį. Šios savybės išryškina būtinybę kurti specialiai pritaikytas kriokonservavimo strategijas, kad atitirpinus būtų išsaugotas spermos gyvybingumas ir funkcionalumas.

Veiksmingų žuvų spermos kriokonservavimo protokolų kūrimas apima keletą esminių etapų:



- Spermos surinkimas: itin svarbu gauti kokybiškos spermos, be jokių teršalų. Priklausomai nuo žuvų rūšies, taikomi įvairūs metodai: pilvo masažas, aspiracija arba tiesioginis išgavimas iš sėklidžių. Ypač svarbu vengti užteršimo šlapimu ar kitomis medžiagomis, galinčiomis anksti aktyvuoti judrumą.
- Kokybės analizė: spermos kokybės vertinimas yra būtinas norint atrinkti tinkamus mėginius šaldymui. Vertinami tokie parametrai kaip judrumas, gyvybingumas, pH ir osmolingumas. Dažnai naudojamos pažangios kompiuterinės sistemos, leidžiančios užtikrinti tikslumą.
- Prailgiklių („extenders“) sudarymas: tai buferiniai tirpalai, kurie apsaugo spermą nuo priešlaikinio aktyvavimo ir sudaro optimalias sąlygas šaldymui. Dažniausiai naudojami komponentai: gliukozė, kiaušinio trynys, antioksidantai ir krioprotektoriai, tokie kaip DMSO arba glicerolis. Prailgiklių sudėtis priklauso nuo žuvų rūšies ir specifinių reikalavimų.
- Šaldymas ir atšildymas: sperma paprastai supilstoma į vadinamąsias prancūziškas šiaudeles arba kriovialus ir šaldoma kontroliuojamu greičiu, vėliau saugoma skystame azote (-196 °C). Atšildyti reikia greitai, dažniausiai tai daroma vandens vonelėje, siekiant maksimaliai išsaugoti gyvybingumą. 3.6 pav. pavaizduoti pagrindiniai spermos šaldymo etapai.



3.6 pav. Spermos šaldymo procesas: (A) upėtakių spermos išgavimas kaniuliacija, (B) praskiedimas krioprotektoriumi papildytu prailgikliu, (C) užpildymas į 0,5 ml prancūziškus šiaudelius (įterptas su skirtingais šiaudeliais, kriovialais ir PVA milteliais sandarinimui), (D) šaldymas ant plūduriuojančio įtaiso polistireninėje dėžėje su skystu azotu $N_2(l)$, (E) laikymas $N_2(l)$ talpykloje, (F) patelių ikrų išspaudimas, (G) atšildymas vandens vonelėje, (H–J) apvaisinimas (Fletcher & Rise, 2012)



Oocitų kriokonservavimas

Skirtingai nei spermos atveju, kiaušialąsčių kriokonservavimas kelia kur kas didesnių iššūkių. Dėl didelio jų dydžio, sudėtingos struktūros ir riboto krioprotektorių (CPA) pralaidumo šios ląstelės itin jautrios šalčio pažeidimams. Tokios problemos kaip jautrumas žemai temperatūrai, ledo kristalų susidarymas ląstelių viduje ir krioprotektorių toksiškumas yra ypač ryškios. Be to, daugybiniai membraniniai sluoksniai ir didelis lipidų kiekis dar labiau apsunkina kiaušialąsčių išsaugojimą.

Pastaruoju metu daug dėmesio skiriama ankstyvųjų vystymosi stadijų kiaušialąsčių išsaugojimui, nes jų struktūrinis paprastumas gali sumažinti jautrumą šalčio pažeidimams. Taikomos įvairios strategijos: laipsniškas CPA šalinimas siekiant sumažinti toksiškumą, tyrimai dėl atsparumo žemai temperatūrai bei vitrifikacijos metodų taikymas. Vitrifikacija – tai itin greitas užšaldymas naudojant didelę CPA koncentraciją, leidžiantis išvengti ledo kristalų susidarymo. Vis dėlto šio metodo sėkmei trukdo iššūkiai, susiję su tolygiu CPA pasiskirstymu ir jų toksiškumo mažinimu.

4.2. Embrionų kriokonservavimas

Žuvų embrionų kriokonservavimas, kurio tikslas – išsaugoti tiek motininę, tiek tėvinę genetinę medžiagą, turi didelį potencialą pagerinti akvakultūros reprodukcijos valdymą. Tačiau, nepaisant šios perspektyvos, sėkmingas žuvų embrionų kriokonservavimas tebėra sudėtingas uždavinys dėl biologinio embrionų sudėtingumo – jų didelio dydžio, daugiakomponentės struktūros ir riboto krioprotekcinio medžiagų (CPA) pralaidumo. Šie veiksniai kartu su tokiais barjeriais kaip trynio sincitinis sluoksnis (YSL) trukdo veiksmingai paskirstyti CPA ir vandenį visame embrione (3.7 pav., Hagedorn et al., 1997).



3.7 pav. Oto embrionas uodeginio pumpuro stadijoje, kuriame matomi skirtingi apvalkalai ir skyriai: chorionas (rodyklė), trynio sincitinis sluoksnis (rodyklės galas), trynio maišas (ys), perivitelinis tarpas (pvs) ir embriono skyrius (ec) (Hagedorn et al., 1997)

Viena pagrindinių kliūčių kriokonservuojant žuvų embrionus yra didelis jų vandens kiekis, kuris užšaldant ir atšildant gali lemti ledo kristalų susidarymą ir ląstelių pažeidimus.



Nors ankstyvųjų stadijų embrionai teoriškai yra struktūriškai paprastesni ir palankesni išsaugojimui, jie ypač jautrūs žemai temperatūrai ir krioprotektorių (CPA) toksiskumui, o tai dar labiau apsunkina jų kriokonservavimą.

Tyrimai, kuriuose nagrinėjamas embrionų jautrumas žemai temperatūrai, parodė, kad ankstyvos vystymosi stadijos yra žymiai jautresnės šalčiui nei vėlyvesnės. Siekiant sumažinti pažeidimus dėl atšalimo, taikomos įvairios strategijos: embriono struktūros modifikavimas bei apsauginių medžiagų, tokių kaip antifriziniai baltymai (AFP), naudojimas. Šie metodai rodo potencialą stiprinant atsparumą šalčiui, tačiau iki šiol nepasiektas nuoseklus sėkmės lygis.

Kaip vienas iš būdų įveikti šiuos iššūkius, siūloma taikyti vitrifikaciją – itin greito užšaldymo metodą, kuriuo siekiama išvengti ledo susidarymo. Tačiau šiam metodui reikia didelių CPA koncentracijų, kurios gali būti toksiškos ir sunkiai tolygiai pasiskirstyti embrione dėl riboto jo pralaidumo. Todėl šiuo metu eksperimentuojama su embriono pralaidumo didinimu ir efektyvesnių CPA įvedimo sistemų kūrimu, siekiant įveikti šiuos apribojimus.

Tarp naujausių pasiekimų – metodai, padedantys apeiti tokius barjerus kaip trynio sincitinis sluoksnis (YSL) ir pagerinti CPA įsiskverbimą į embrioną. Tyrinėjami tokie metodai kaip CPA mikroinjekcija arba genetinis inžinerijos taikymas, siekiant padidinti embriono pralaidumą. Be to, natūralių antifrizinių baltymų naudojimas rodo potencialą mažinant ledo kristalų susidarymą ir apsaugant nuo šalčio sukeltų pažeidimų. Nors šie metodai kol kas tebėra eksperimentinio pobūdžio, jie suteikia vertingų įžvalgų apie embrionų kriokonservavimo ateitį.

Norint sėkmingai įveikti žuvų embrionų kriokonservavimo iššūkius, būtinas tarpdisciplininis bendradarbiavimas ir technologinės naujovės. Šiuo metu daugiausia dėmesio skiriama ląsteliniu lygiu veikiančių apsaugos priemonių tobulinimui ir CPA įvedimo metodų gerinimui. Perspektyvios kryptys apima pažangių lazerinių technologijų taikymą, siekiant laikinai suformuoti poras embriono dangaluose, ir genetiškai modifikuotų žuvų linijų kūrimą, turinčių didesnę atsparumą užšalimo sukeliams pažeidimams.

Nuosekliai plėtojant šias tyrimų kryptis, žuvų embrionų kriokonservavimas gali tapti patikima akvakultūros priemone, padedančia išsaugoti vertingus genetinius išteklius.

Kriokonservavimo technologija sukurta daugeliui žuvų rūšių (Betsy et al., 2022):

- Ši technologija leidžia išsaugoti tinkamiausio amžiaus veislinių patinų miltus, kuriuos galima panaudoti bet kuriuo metu ateityje.
- Padeda išvengti artimo giminystės kryžminimosi, nes kriokonservuotais spermatozoidais galima lengvai keistis tarp veisyklų.
- Dėl šios technologijos spermatozoidai tampa prieinami bet kuriuo metų laiku.
- Galima veisti net ir ne dauginimosi sezono metu.
- Suderinamas abiejų lyčių gametų prieinamumas, tad galima efektyviau naudoti spermą.
- Palengvėja reprodukcinių žuvų būrio valdymas ūkiuose.
- Prisidedama prie stiprių ir gyvybingų palikuonių veisimo per vidurūšinį hibridizavimą.
- Įveikiamos problemos, susijusios su trumpu gametų gyvybingumu.
- Sudaromos sąlygos saugoti pageidaujamas genetines linijas.



- Galima kryžminti skirtingais metų laikais.
- Skatinamas gamtinio genetinio fondo (germplazmos) saugojimas, reikalingas genetinės atrankos programoms ar rūšims išsaugoti.
- Kriokonservuoti spermatozoidai gali būti naudingi hibridizavimo programose bei genų inžinerijos tyrimuose su žuvimis.
- Atveriamas daug kitų galimybių, tokių kaip gyvybingų gametų kriobankų kūrimas (kaip gyvulininkystėje), genų bankų plėtra ir genetinės manipuliacijos žuvininkystėje.

Kriokonservavimas – tai iš esmės transformuojanti biotechnologinė priemonė akvakultūroje, suteikianti reikšmingos naudos tiek genetinio paveldo išsaugojimui, tiek veisimo programoms ir biologinės įvairovės apsaugai. Nors tam tikrų iššūkių, ypač susijusių su embrionų ir kiaušialąsčių konservavimu, vis dar išlieka, nuolat tobulinami krioprotektorių metodai, genetiniai įrankiai bei tarpdisciplininiai tyrimai teikia vilčių įveikti šiuos barjerus. Dėl ateities proveržių neabejotinai buvo plečiamos kriokonservavimo taikymo galimybės ir efektyvumas, užtikrinant įvairesnę jos naudojimą tiek akvakultūroje, tiek kitose srityse. Dėl nuolatinės pažangos kriokonservavimas tampa neatsiejama priemone, padedančia užtikrinti tvarią akvakultūros plėtrą ir išsaugoti vandens biologinę įvairovę (Fletcher ir Rise, 2012).

5. Etiniai, aplinkosaugos ir reguliavimo aspektai

5.1. Biotechnologijų etika ir visuomenės požiūris

Gyvūnų gerovė genetinio modifikavimo srityje

Genetinės modifikacijos taikymo akvakultūroje etinės pasekmės yra reikšmingos, ypač gyvūnų gerovės požiūriu. Genetinėmis intervencijomis, tokiomis kaip transgenezė ar genų redagavimas, dažnai siekiama pagerinti produkcinis požymius – augimo tempą, atsparumą ligoms ar prisitaikymą prie aplinkos sąlygų. Tačiau šie pokyčiai gali netyčia sukelti fiziologinį stresą ar sveikatos sutrikimus. Pavyzdžiui, spartesnis transgeninių žuvų augimas gali lemti skeleto deformacijas, sumažėjusį imuninės sistemos aktyvumą ar pakitusią medžiagų apykaitą. Kritikai teigia, kad produktyvumo iškėlimas virš gerovės gali pažeisti šių organizmų etiškai pagrįstą priežiūrą, keldamas klausimų apie pusiausvyrą tarp inovacijų ir humaniško elgesio.

Uždarų akvakultūros sistemų pobūdis dar labiau sustiprina šiuos rūpesčius. Žuvis, auginamos tokiomis sąlygomis, dažnai laikomos itin tankiose grupėse, o tai didina stresą, ligų riziką ir sukelia elgsenos pokyčius. Etiniai svarstymai taip pat apima klausimą, ar genetiškai modifikuotos žuvis yra labiau ar mažiau tinkamos išgyventi tokiomis sąlygomis, lyginant su laukiniais atstovais. Siekiant užtikrinti, kad genetiškai modifikuotų vandens organizmų gyvenimo kokybė nebūtų nepagrįstai pažeidžiama, būtina kurti specialiai šiems organizmams pritaikytus gerovės vertinimo kriterijus.

Ekologinis vientisumas ir biologinė įvairovė

Be pavienių organizmų gerovės, etiniai svarstymai apima ir platesnę biotechnologinių intervencijų poveikį ekosistemoms. Genetiškai modifikuotų ar selektyviai išvestų rūšių



Įvedimas į akvakultūros sistemas ar natūralią aplinką kelia riziką ekologiniam vientisumui. Pavyzdžiui, transgeninės žuvys, sparčiau augančios, gali išstumti vietines rūšis dėl išteklių, taip pažeisdamos vietinių ekosistemų pusiausvyrą ir galimai prisidėdamos prie laukinių populiacijų nykimo ar net išnykimo. Dėl šių aspektų pabrėžiama moralinė atsakomybė užtikrinti, kad biotechnologijų taikymas nepakenktų vandens ekosistemų biologinei įvairovei ir atsparumui.

Etinė diskusija taip pat siejama su žmogaus vaidmeniu biologinės įvairovės valdyme. Nors biotechnologijos gali pasitarnauti gamtos saugos tikslais – pavyzdžiui, kriokonservuojant nykstančių rūšių genetinę medžiagą, – jos taip pat kelia klausimų apie žmogaus teisę keisti genetinius kodus ekonominiais ar ekologiniais tikslais. Didžiausias iššūkis – rasti pusiausvyrą tarp pozityvaus biotechnologijų potencialo panaudojimo ir natūralių vandens rūšių evoliucinių procesų išsaugojimo.

5.2. Teisiniai ir reguliavimo iššūkiai

Pasauliniai standartai ir gairės

Biotechnologijų taikymo akvakultūroje valdymas yra sudėtinga ir nuolat besivystanti sritis. Tokia tarptautinė organizacija kaip Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacija (FAO) parengė gaires, skirtas saugiam ir etiškam biotechnologijų naudojimui. Šiose gairėse pabrėžiamas atsargumo principas, raginantis atlikti išsamius rizikos vertinimus ir nuolatinę stebėseną prieš patvirtinant ir išleidžiant genetiškai modifikuotus organizmus (GMO) į akvakultūros sistemas.

Vienas iš pagrindinių tarptautinių standartų tikslų – suderinti reglamentavimą tarp valstybių, siekiant užtikrinti nuoseklias saugos priemones ir aplinkos apsaugos standartus. Tai ypač svarbu atsižvelgiant į vandens ekosistemų tarpšieninį pobūdį ir galimybę, kad pabėgusios žuvys gali paveikti kaimyninių šalių vandenį. Tarpvalstybinis bendradarbiavimas pasirašant sutartis ir susitarimus yra svarbi priemonė vienodoms praktikoms užtikrinti ir galimai kylantiems pavojams mažinti.

Nacionaliniai reguliavimo metodai

Nacionaliniu lygmeniu biotechnologijų reglamentavimo sistemos labai skiriasi, atspindėdamos skirtingus šalių prioritetus, technologines galimybes ir visuomenės požiūrį į biotechnologijas. Tokios šalys kaip Jungtinės Amerikos Valstijos ir Kanada turi išplėtotas sistemas, skirtas genetiškai modifikuotų organizmų saugumui ir veiksmingumui vertinti – šiose sistemose taikomi išsamūs peržiūros procesai, apimantys mokslinius, aplinkosaugos ir visuomenės sveikatos aspektus. Tuo tarpu kituose pasaulio regionuose gali trūkti visapusiškų reglamentavimo struktūrų, dėl to atsiranda priežiūros spragų ir galimų rizikų.

Reglamentavimo procesai dažnai grindžiami kelių etapų metodika: pirmiausia atliekami laboratoriniai tyrimai, po to kontroliuojami lauko bandymai, tik tada leidžiama taikyti plačiai. Taip siekiama įvertinti naujų biotechnologijų poveikį aplinkai, ekonomikai ir visuomenei. Vis dažniau pripažįstama, kad visuomenės konsultavimas ir sprendimų priėmimo



skaidrumas yra esminės reguliavimo sistemos sudedamosios dalys, padedančios užtikrinti pasitikėjimą ir tai, kad sprendimai atitiktų visuomenės vertybes.

Saugumo vertinimai ir patvirtinimo procesai

Saugumo vertinimai yra esminė biotechnologijų reglamentavimo sistemų dalis, suteikianti mokslinį pagrindą įvertinti potencialias rizikas. Paprastai šie vertinimai apima kelias pagrindines sritis.

Aplinkosaugos rizikos: vertinama genetiškai modifikuotų organizmų (GMO) pabėgimo tikimybė ir galimas poveikis ekosistemoms – konkurencija su vietinėmis rūšimis, hibridizacija, buveinių pokyčiai.

Rizikos žmonių sveikatai: siekiama užtikrinti, kad genetiškai modifikuotos žuvis, skirtos vartoti, neturėtų alergenų, toksinų ar netikėtų genetinių pokyčių, galinčių pakenkti vartotojams.

Ekosistemų stebėseną: patvirtinus įgyvendinamos monitoringo programos, skirtos nenumatytiems poveikiams aptikti ir švelninti, taip užtikrinant ilgalaikį tvarumą.

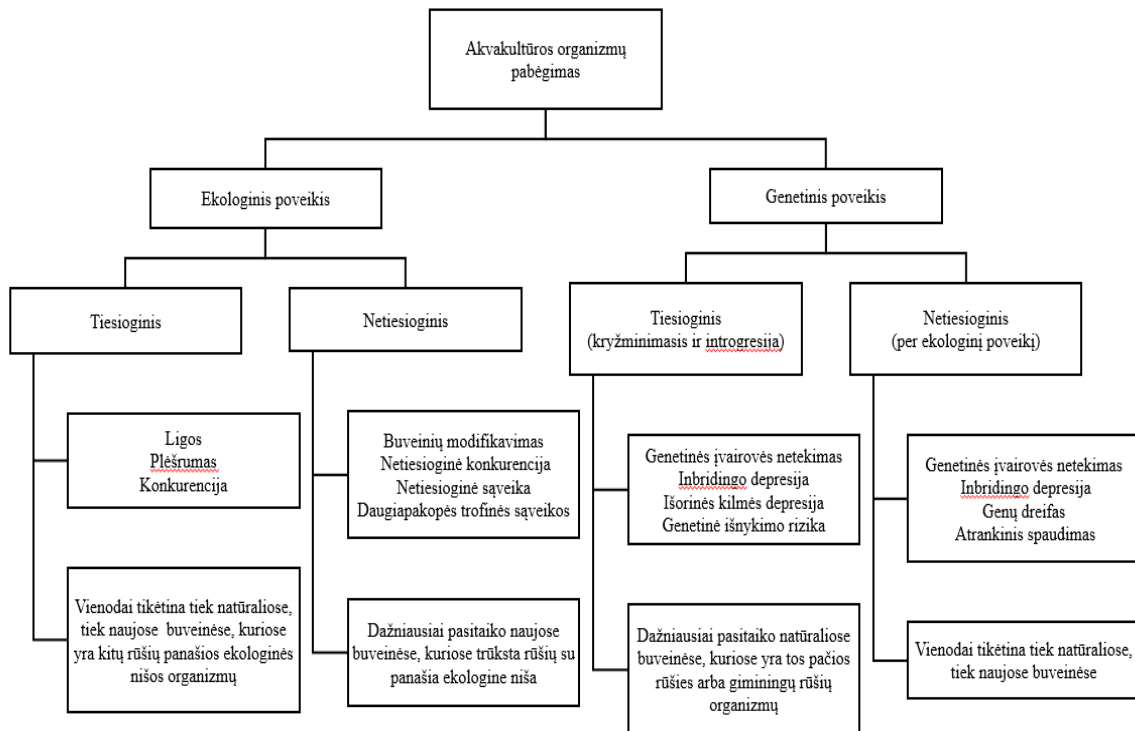
Patvirtinimo procesai dažnai vyksta koordinuojant kelioms institucijoms, įskaitant aplinkosaugos, žemės ūkio ir visuomenės sveikatos sritis. Griežtais moksliniais vertinimais, derinamais su visuomenės nuomone, siekiama rasti pusiausvyrą tarp inovacijų diegimo, saugumo ir etikos principų laikymosi.

5.3. Biotechnologijų poveikis aplinkai ir atsakomybė

5.3.1. Rizikų valdymas

Viena reikšmingiausių aplinkosaugos rizikų, susijusių su biotechnologijų taikymu akvakultūroje, yra genetinė tarša – tai procesas, kai genai iš genetiškai modifikuotų arba selektyviai išvestų rūšių perduodami laukinėms populiacijoms. Tai gali įvykti per kryžminimąsi, dėl kurio atsiranda genetinė homogenizacija ir prarandamos vietinės rūšims būdingos prisitaikymo savybės. Tokios genetinės introgresijos ilgalaikės pasekmės gali būti sumažėjęs atsparumas aplinkos pokyčiams ir biologinės įvairovės nykimas.

Domestikacijos selekcija veikia akvakultūroje auginamų gyvūnų genetines ir fenotipines savybes, o šie pokyčiai gali sukelti įvairų poveikį aplinkai, jei tokie gyvūnai patenka į natūralią gamtą. 3.8 pav. pateikiama santrauka apie mechanizmus, kurie lemia šiuos poveikius. Jie suskirstyti į keturias kategorijas: tiesioginis ekologinis poveikis, netiesioginis ekologinis poveikis, tiesioginis genetinis poveikis ir netiesioginis genetinis poveikis.



3.8 pav. Galimas akvakultūros pabėgusių organizmų poveikis aplinkai

Akvakultūros sistemos yra ypač pažeidžiamos, kai į natūralias ekosistemas patenka ūkiuose auginamų žuvų. Šios ištrūkusios žuvys gali konkuruoti su laukinėmis populiacijomis dėl išteklių, platinti ligas ir sutrikdyti mitybos tinklo dinamiką. Šiai rizikai mažinti reikalingos patikimos izoliavimo strategijos, pavyzdžiui, fiziniai barjerai ir sterilių genetiškai modifikuotų žuvų kūrimas, kad jos negalėtų daugintis laukinėje gamtoje.

Sąveika su laukinėmis populiacijomis

Ūkiuose auginamų ir laukinių populiacijų sąveika apima ne tik genetinį poveikį. Transgeninės žuvys, pasižyminčios geresnėmis savybėmis, pavyzdžiui, greitesniu augimu ar didesniu atsparumu ligoms, gali turėti ekologinių pranašumų prieš laukines žuvis. Dėl šių pranašumų gali pasikeisti plėšrūnų ir grobuonių santykiai, konkurencijos dinamika ir buveinių naudojimas.

Norint numatyti ir valdyti šią sąveiką, būtina atlikti genetiškai modifikuotų žuvų elgsenos ir ekologinio vaidmens tyrimus. Ilgalaikiai ekologiniai tyrimai kartu su prognozavimo modeliavimu gali padėti nustatyti galimą riziką ir nukreipti valdymo praktiką.

Ilgalaikis tvarumas

Norint užtikrinti ilgalaikį akvakultūros biotechnologijų tvarumą, reikia laikytis holistinio požiūrio, kuris apimtų ekologinius, ekonominius ir socialinius aspektus. Tai apima buveinių naikinimo mažinimą, išteklių naudojimo optimizavimą ir laukinių populiacijų



apsaugą. Biotechnologijų pažanga, pavyzdžiui, kuriant aplinkai nekenksmingus pašarus ir tobulinant atliekų tvarkymo sistemas, gali prisidėti prie tvaresnės akvakultūros praktikos.

Stebėseną ir pritaikomasis valdymas yra labai svarbūs tvarios akvakultūros komponentai. Nuolat vertindamos biotechnologinių intervencijų poveikį aplinkai ir atitinkamai koreguodamos praktiką, suinteresuotosios šalys gali suderinti produktyvumą ir ekologinę atsakomybę.

5.3.2. Pažangos ir atsakomybės pusiausvyra

Biotechnologijų integravimas į akvakultūrą atveria didžiules galimybes spręsti tokias pasaulines problemas kaip aprūpinimas maistu ir biologinės įvairovės išsaugojimas. Tačiau šią pažangą turi lydėti tvirtas pasiryžimas laikytis etikos principų, griežta reguliavimo priežiūra ir aktyvi aplinkosauga. Skatinant mokslininkų, politikos formuotojų, pramonės suinteresuotųjų šalių ir visuomenės bendradarbiavimą, akvakultūra gali būti vystoma naujoviškai ir tvariai.

Etiniai, aplinkosaugos ir reguliavimo aspektai yra ne tik kliūtys, kurias reikia įveikti, bet ir yra neatsiejami nuo atsakingos akvakultūros biotechnologijų pažangos. Kruopščiai planuojant, skaidriai priimant sprendimus ir vykdant nuolatinį mokslinį tyrimą, šis sektorius gali išnaudoti savo potencialą ir kartu užtikrinti vandens ekosistemų bei nuo jų priklausančių bendruomenių gerovę (Fletcher & Rise, 2012).

Santrauka

Dėl visuotinio atšilimo labai sutriko vandens rūšių veisimosi ciklai, augimo tempai ir išgyvenamumas. Dėl kylančios vandens temperatūros keičiasi neršto laikas ir medžiagų apykaitos greitis, dėl to nesutampa su maisto prieinamumu ir susidaro neoptimalios sąlygos lervutėms vystytis. Tokios rūšys kaip atlantinės menkės ir europiniai ešeriai neršia anksčiau, todėl jų palikuonių išgyvenamumas mažėja. Be to, dėl padidėjusios temperatūros vandenyje gali sumažėti deguonies kiekis, o tai kelia stresą lervoms ir turi įtakos jauniklių vystymuisi. Nors kai kurios rūšys pasižymi genetiniu prisitaikymu prie šių pokyčių, greitai aplinkos pokyčiai dažnai pranoksta populiacijų gebėjimą prisitaikyti, todėl ilgai jų populiacijos mažėja.

Akvakultūra ėmėsi biotechnologijų, kad sušvelnintų šiuos iššūkius ir padidintų auginamų rūšių atsparumą. Selekcinio veisimo programose daugiausia dėmesio skiriama tokioms savybėms kaip atsparumas karščiui, ligoms ir augimo efektyvumas. Genominė atranka pagreitina šį procesą, nes pageidaujamoms savybėms dauginti naudojami genetiniai žymenys. Pavyzdžiui, atlantinės lašišos buvo išvestos taip, kad toleruotų aukštesnę temperatūrą ir hipoksines sąlygas, o genominės priemonės buvo panaudotos kuriant ligoms atsparias vaivorykštinių upėtakių ir kitų rūšių žuvų atmainas.

CRISPR/Cas9 technologija tapo revoliucine priemone akvakultūroje, leidžiančia tiksliai ir tikslingai modifikuoti žuvų genomus. Šis metodas leidžia pagerinti tokias pagrindines savybes kaip augimas, raumenų kokybė, atsparumas ligoms ir prisitaikymas prie aplinkos. Pavyzdžiui, atlikus tokių rūšių kaip Nilo tilapija ir kanalinių šamų genetines modifikacijas, buvo pasiektas spartesnis augimas ir geresnis raumenų vystymasis, nes buvo paveiktas



miostatino (*mstn*) genas. Panašiai CRISPR/Cas9 buvo panaudotas siekiant padidinti atlantinių lašišų ir baltųjų amūrų atsparumą ligoms, redaguojant su imunitetu susijusius genus ir patogenų atpažinimo kelius.

Be pavienių savybių gerinimo, CRISPR technologija taikoma lyties nustatymo ir populiacijos valdymo tikslais. Pavyzdžiui, nevaisingų populiacijų kūrimas padeda sumažinti ekologinę riziką, jei žuvis patenka į natūralią aplinką. Nepaisant pažangos, ši technologija susiduria su iššūkiais – nepageidaujami genomo pakitimai („off-target effects“) ir etinio pobūdžio klausimai, ypač susiję su gyvūnų gerove bei ekologinėmis pasekmėmis, reikalauja griežto reguliavimo ir tolesnių tyrimų.

Kriokonservavimas – dar viena svarbi technologija, siūlanti genetinių išteklių išsaugojimo ir veisimo efektyvumo didinimo sprendimus. Išsaugant gametas ir embrionus itin žemoje temperatūroje, ši technika prisideda prie biologinės įvairovės išsaugojimo bei veisimo programų vykdymo įvairiais metų laikais ir skirtingose geografinėse. Vis dėlto tokie iššūkiai kaip jautrumas šalčiui ar krioprotektorių toksiskumas, ypač kiaušialąstėse ir embrionuose, rodo, kad būtina tęsti mokslinius tyrimus, siekiant optimizuoti protokolus ir pagerinti išsaugojimo sėkmės rodiklius.

Biotechnologijų integravimas į akvakultūrą kelia svarbių etinių ir aplinkosaugos klausimų. Genetiškai modifikuotų organizmų (GMO) galimybė patekti į natūralias ekosistemas ir kryžmintis su laukinėmis populiacijomis kelia pavojų genetiniam vientisumui ir biologinei įvairovei. Nacionalinio ir tarptautinio lygmens reglamentavimo sistemos atlieka svarbų vaidmenį sprendžiant šiuos klausimus – jose akcentuojami rizikos vertinimai, stebėseną ir visuomenės įtraukimas. Etiniai aspektai taip pat apima gyvūnų gerovę, ypač siekiant užtikrinti, kad biotechnologiniais metodais nebūtų pažeista auginamų rūšių sveikata ir pabloginta gyvenimo kokybė.

Akvakultūros ateitis priklauso nuo technologinės pažangos ir tvarumo pusiausvyros. Tokios inovacijos kaip CRISPR/Cas9 ir genominė atranka turi didžiulį potencialą stiprinti atsparumą ir produktyvumą. Bet tam būtinas tarpdisciplininis bendradarbiavimas, stipri valdymo sistema ir atsakingas požiūris į aplinką, kad būtų sumažintas ekologinis poveikis ir užtikrintas ilgalaikis sektoriaus gyvybingumas.

Tik laikantis etiškos praktikos ir tvarumo principų akvakultūra gali tapti reikšmingu sprendimu mažinant pasaulinio maisto saugumo iššūkius ir išsaugant vandens biologinę įvairovę.

Šiame skyriuje pabrėžiamas poreikis skubiai spręsti klimato kaitos ir akvakultūros tvarumo iššūkius, pasitelkiant inovatyvius ir atsakingus biotechnologinius sprendimus. Išnaudodama šių technologijų potencialą, akvakultūros pramonė gali aktyviai prisidėti prie pasaulinių biologinės įvairovės išsaugojimo, atsparumo klimato kaitai ir maisto saugumo užtikrinimo pastangų.



Literatūra

- Angilletta, M. J., Steury, T. D., & Sears, M. W. (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: Fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative and Comparative Biology*, 44(6), 498–509. <https://doi.org/10.1093/icb/44.6.498>
- Betsy, C. J., C, S., & Sampath Kumar, J. S. (2022). Cryopreservation and its application in aquaculture. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99629>
- 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/10.1111/raq.12571>
- Chevin, L. M., Lande, R., & Mace, G. M. (2010). Adaptation to climate change: Combining plasticity and evolution in a changing world. *Ecology Letters*, 13(11), 1318–1333. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01552.x>
- Durant, J. M., Hjermann, D. Ø., Ottersen, G., & Stenseth, N. C. (2007). Trophic match–mismatch and climate change: Linking phenologies in predator and prey. *Ecology*, 88(8), 2405–2412. <https://doi.org/10.1890/06-2089.1>
- Fischer, J. R., Brommer, J. E., Helm, B., & Visser, M. E. (2014). Evolutionary responses of aquatic species to climate change. *Nature Climate Change*, 4, 42–51. <https://doi.org/10.1038/nclimate2067>
- Fletcher, G. L., & Rise, M. L. (Eds.). (2012). *Aquaculture biotechnology*. Wiley-Blackwell.
- Gjøen, H. M., Refstie, T., Sahara, E., Ruane, N. M., L'Abe-Lund, T. M., & Fjellidal, P. G. (2018). Aquaculture breeding programs for climate resilience. *Aquaculture Reports*, 12, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.02.003>
- 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. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2030>
- Heath, M. R., Speirs, D. C., & Steele, J. H. (2014). Climate change and fish growth. *Fish and Fisheries*, 15(3), 319–329. <https://doi.org/10.1111/faf.12025>
- Houston, R. D., Bishop, S. C., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Taggart, J. B., McAndrew, B. J. (2018). Selective breeding for disease resistance in aquaculture species: Challenges and progress. *Fisheries Research*, 200, 166–181. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.09.020>
- Huntingford, F. A., Turnbull, J. F., Kadri, S., Bergeron, R., Klinger, E., Ruthin, M. L. (2020). The potential of selective breeding for climate resilience in aquaculture species. *Aquaculture*, 525, 735303. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735303>
- Yang, Z., Yu, Y., Tay, Y. X., & Yue, G. H. (2022). Genome editing and its applications in genetic improvement in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 178–191. <https://doi.org/10.1111/raq.12591>
- Jørgensen, C., Ernande, B., Fiksen, Ø., & Dieckmann, U. (2017). Local adaptation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to thermal variation. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(11), 2435–2446. <https://doi.org/10.1111/jeb.13199>
- Li, M., Dai, S., Liu, X., Xiao, H., & Wang, D. (2021). A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tilapia. *Hydrobiologia*, 848, 3865–3881. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04524-5>
- Lynch, M., & Lande, R. (1993). Evolution and extinction in changing environments. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(7), 142–144. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90245-Y](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90245-Y)



- Liu, Y., et al. (2020). Genomic selection for heat tolerance in rainbow trout: A practical approach. *Journal of Fish Biology*.
- O'Reilly, C. M., Alin, S. R., Plisnier, P.-D., Cohen, A. S., & McKee, B. A. (2008). Impacts of climate change on fish populations. *Science*, 319(5865), 183–186. <https://doi.org/10.1126/science.1149477>
- Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 637–669. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110100>
- Pörtner, H. O., Langenbuch, M., & Reipschläger, A. (2004). Biological impact of elevated CO₂ in aquatic ecosystems: Lessons from animal physiology and Earth history. *Journal of Oceanography*, 60(4), 705–718. <https://doi.org/10.1007/s10872-004-5763-6>
- Tompkins, E. M., White, E. C. & Reeves, A. R. (2017). Effects of warming on fish breeding patterns. *Global Change Biology*, 23(9), 3365–3375. <https://doi.org/10.1111/gcb.13643>
- Vázquez, R., Ponzoni, R. W., Nguyen, N. H., & Houston, R. D. (2018). Genomic selection in aquaculture for disease resistance. *Aquaculture International*, 26(1), 65–75. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0192-7>
- Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O., & Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416(6879), 389–395. <https://doi.org/10.1038/416389a>
- 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/10.1038/srep21284>
- 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>