



INSTITUT ZA OCEANOLOGIJU I RIBARSTVO SPLIT

Istraživanje mogućnosti uzgoja ranih razvojnih stadija hobotnice
(*Octopus vulgaris*) za potrebe repopulacije



Split, rujan 2025.

Institut za oceanografiju i ribarstvo Split

Istraživanje mogućnosti uzgoja ranih razvojnih stadija hobotnice
(*Octopus vulgaris*) za potrebe repopulacije

Završno izvješće

Voditelj projekta: dr.sc. Leon Grubišić

Suradnici: dr.sc. Tanja Šegvić Bubić

dr.sc. Iva Žužul Vrgoč

dr.sc. Igor Talijančić

dr.sc. Ivana Bušelić Garber

dr.sc. Ivana Lepen Pleić

Lovre Stanić

Luka Žuvić

Luka Čulić

Pero Ugarković

Voditelj projekta

Dr.sc. Leon Grubišić

Ravnateljica instituta

dr.sc. Živana Ninčević Gladan

Zahvala:

Ovaj projekt je proveden zahvaljujući financijskoj potpori Hrvatskog saveza za športski ribolov na moru iz fonda za namjensko korištenje novčanih sredstava prikupljenih prodajom dozvola za sportski ribolov na moru.

Zahvaljujemo športskim podvodnim ribolovcima i ronionicima koji su sudjelovali u prikupljanju biološkog materijala.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.2. Opis vrste i uzgojne tehnologije.....	5
1.2.1 Biološka i ekološka obilježja hobotnice	5
1.2.2. Morfološka obilježja i reprodukcija.....	8
1.1.3. Prehrana i ponašanje	11
1.1.4. Uzgoj i repopulacija.....	12
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	13
5. MATERIJALI I METODE	14
2.1. Prikupljanje matičnog jata	14
2.2. Određivanje mase i spola.....	16
2.3. Održavanje matičnog jata hobotnica zatvorenog tipa.....	17
2.4. Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima	19
2.5. Rast hobotnica u kontroliranim uvjetima	21
2.6. Ekološki uvjeti za vrijeme održavanja matičnog jata	21
2.7. Reprodukcija u eksperimentalnim uvjetima	22
2.8. Hranjenje, održavanje i puštanje paraličinki u more	23
2.9. Prikupljanje jedinki za provjeru uspješnosti repopulacije	24
2.10. DNK izolacija.....	26
2.11. Genotipizacija mikrosatelitnih biljega.....	26
2.11.1. Izbor mikrosatelitnih biljega	26
2.11.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	27
2.12. Statistička analiza podataka.....	28
3. REZULTATI I RASPRAVA	29
3.1. Rezultati prikupljanja matičnog jata	29
3.2. Rast hobotnice u kontroliranim uvjetima	31
3.3. Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima	35
3.4. Plodnost	39
3.5. Genetska raznolikost hobotnice i analiza srodnosti	41
4. ZAKLJUČCI	44
5. LITERATURA	46
6. PRILOZI	50

1.UVOD

Globalno, ribarstvo predstavlja jedan od ključnih sektora za prehrambenu sigurnost stanovništva, budući da osigurava visokovrijedne bjelančevine, visokonezasićene masne kiseline i druge esencijalne nutrijente. Održivo upravljanje ribljim i drugim biozalihami je od presudne važnosti, jer omogućuje dugoročnu dostupnost resursa i očuvanje ravnoteže morskih ekosustava. U sklopu takvog upravljanja značajnu ulogu imaju i mjere repopulacije koje dobivaju osobitu težinu – one su znak da čovjek prepoznaje vlastitu odgovornost te nastoji obnoviti ono što priroda sama više ne može u istom ritmu nadoknaditi.

Repopulacija (*restocking*) i jačanje biozaliha (*stock enhancement*) predstavljaju ispuštanje uzgojenih ili prenesenih jedinki u prirodno stanište kako bi se obnovile ili povećale populacije koje su oslabljene prelovom, degradacijom staništa ili drugim antropogenim i prirodnim uzrocima. Temeljni cilj repopulacije je obnova populacija do razina koje mogu izdržati održivi ribolov, jačanje biozaliha se provodi kako bi se povećala produktivnost postojećih populacija. U okviru pristupa jačanja biozaliha praksa prepoznaje i pristup koji se zove “ribolov temeljen na uzgoju” ili *sea ranching* koji podrazumijeva uzgoj i ispuštanje organizama radi kasnijeg ciljanog ulova u otvorenim vodama bez naknadnog hranjenja (Lorenzen et al., 2010; Kitada, 2018).

Povijesno gledano, najopsežniji programi repopulacije razvijeni su u Japanu, gdje je tijekom zadnjih 100 godina provedeno više od 80 različitih programa koji su obuhvatili ribe, rakove, školjkaše i alge (Kitada, 2020). U Skandinaviji su krajem 20. stoljeća provedeni programi repopulacije lososa (*Salmo salar*) i bakalara (*Gadus morhua*) s naglaskom na genetsku čistoću i kontrolu bolesti (Araki & Schmid, 2010), dok u Mediteranu postoje pokušaji obnavljanja populacija plemenite periske (*Pinna nobilis*) te eksperimentalna ispuštanja komercijalno važnih vrsta poput kirnje (*Epinephelus marginatus*) (FAO/GFCM, 2023).

Međunarodna organizacija za upravljanjem ribarstvom za Mediteran i Crno more GFCM izradila je smjernice koje prepoznaju „hijerarhiju intervencija“: primarni cilj treba biti smanjenje pritiska ribolova i obnova degradiranih staništa, dok se repopulacija smije razmatrati kada su osnovni uvjeti ekosustava zadovoljeni. Smjernice zahtijevaju definiranje

mjerljivih pokazatelja uspjeha, uključujući stopu preživljenja, doprinos uzgojenih jedinki prirodnom mrijestu, te socioekonomske koristi (FAO/GFCM, 2023).

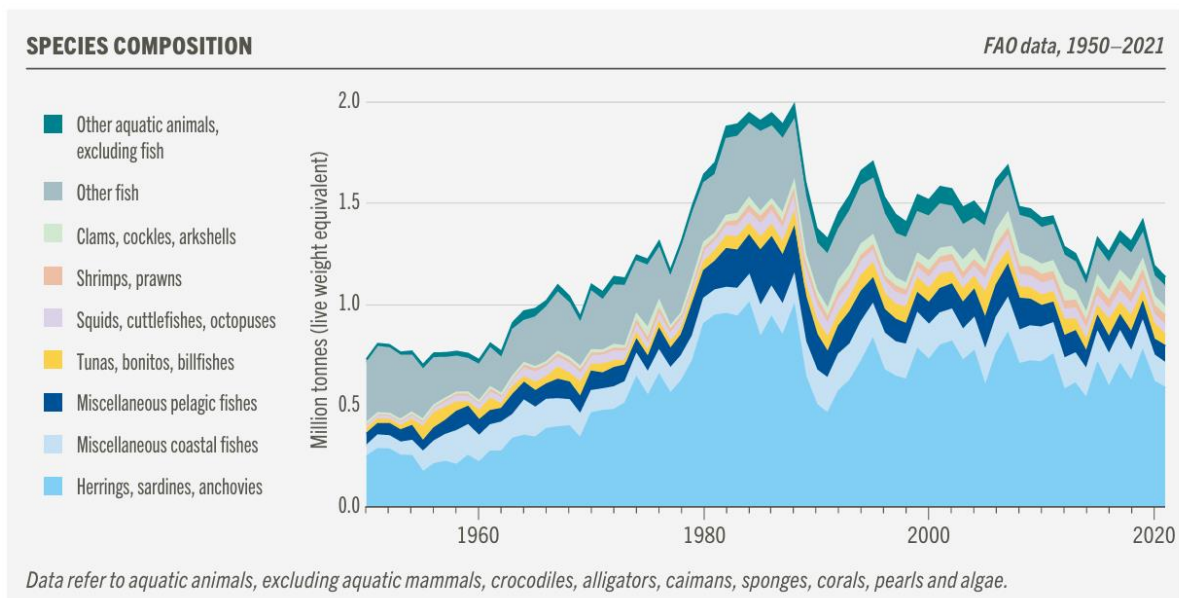
Praćenje uspjeha repopulacije može se provoditi različitim metodama: označavanjem jedinki (fizičke oznake, otisak otolita, genetske oznake), praćenjem pomoću video-nadzora ili akustičnog telemetrijskog sustava, te analizom ribolovnih očevidnika o iskrcaju i uzorkovanja ulova (Lorenzen et al., 2010). Za učinkovitu evaluaciju potrebna je kontrolna populacija ili referentno područje, kako bi se mogla razlikovati prirodna varijabilnost od učinka repopulacije.

Neki od autora prepoznaju situacije kada repopulacija nosi i znatne rizike. Genetski rizici uključuju smanjenje genetske raznolikosti, uvođenje maloadaptiranih genotipova i hibridizaciju s lokalnim populacijama. Studije na lososidima pokazuju da uzgojene jedinke često imaju smanjenu prilagođenost u divljini, a negativni učinci mogu nastati već unutar jedne ili dvije generacije (Araki et al., 2008). Ekološki rizici uključuju prijenos bolesti i parazita, promjenu međuvrsnih odnosa, te potencijalni pritisak na resurse ako se ispušta preveliki broj jedinki (Kitada, 2018). Za konzervacijske translokacije, poput ponovnog uvođenja ugroženih vrsta školjkaša ili morskih cvjetnica, IUCN smjernice (IUCN/SSC, 2013) preporučuju procjenu rizika invazivnosti, bolesti, utjecaja na postojeće zajednice i socioekonomske posljedice. Takvi projekti trebaju biti dugoročno planirani, s definiranim protokolima praćenja i jasnom komunikacijom prema lokalnim zajednicama.

Dakle, repopulacija morskim organizmima je vrijedan alat za obnovu ekosustava i ribarstvenih resursa, i treba je prakticirati kada mjere očuvanje staništa i odgovorno upravljanje ribolovom nisu dovoljne. Uspješni programi karakterizirani su jasnim ciljevima, znanstveno utemeljenim pristupom, genetski i zdravstveno kontroliranim uzgojem, te transparentnim praćenjem i izvještavanjem (Lorenzen et al., 2010; Kitada, 2020; FAO/GFCM, 2023).

Glavonošci (*Cephalopoda*) predstavljaju iznimno važnu skupinu morskih beskralježnjaka s ekološkog i gospodarskog stajališta. Ova skupina obuhvaća predstavnike hobotnica (*Octopoda*), sipa (*Sepiida*) i lignji (*Teuthida*), vrste čije su populacije pod sve većim pritiskom prelova (slika 1), degradacije staništa, zagađenja i klimatskih promjena. Zbog kratkotrajnih životnih ciklusa, brze stope rasta te visoke ovisnosti o kvaliteti okoliša,

glavonošci su posebno osjetljivi na antropogene utjecaje. Istovremeno, njihova biološka obilježja čine ih potencijalno pogodnima za mjere repopulacije s ciljem povećanja abundancije, pod uvjetom da se primijene odgovarajuće tehnologije i prateće mjere upravljanja (FAO, 2020). U Japanu, zemlji s bogatom tradicijom ribarstva i akvakulture, posljednjih desetljeća razvijeni su opsežni programi jačanja biozaliha i tzv. “sea ranchinga” za različite morske organizme, uključujući i glavonošce. Ti programi obuhvaćaju proizvodnju mlađi u kontroliranim uvjetima, puštanje u prirodna staništa, postavljanje umjetnih substrata za mrijest te provođenje sezonskih regulacija ribolova i zabrane ribolova u reproduktivnoj sezoni (Masuda i Tsukamoto, 1998; Arimoto i sur., 2018). Cilj ovih napora je povećanje stope preživljavanja ranih razvojnih stadija, smanjenje pritiska na prirodni mrijest te doprinos stabilizaciji ulova.



Slika 1. Kretanje globalnog ulova po važnijim grupama od 1950. Godine (FAO,2025).

Glavonošci su brzorastući predatori, izuzetno pokretljivi i prilagodljivi, no s ograničenim životnim vijekom — najčešće od jedne do dvije godine. Većina vrsta ima semelparan životni ciklus, što znači da se razmnožavaju samo jednom, nakon čega ugibaju. Mrijest se odvija sezonski, a kod većine vrsta ličinke ili paralarve provode prvu fazu života u pelagičnom stupcu vode prije nego što se nasele na odgovarajuća dna. Ova faza izuzetno je osjetljiva na promjene temperature, saliniteta i raspoloživosti plijena (Boyle i Rodhouse, 2005). Za uspjeh repopulacije presudna je mogućnost zatvaranja reprodukcijskog ciklusa u

zatočeništvu. Kod nekih vrsta, poput japanske hobotnice *Octopus ocellatus* i obične hobotnice *Octopus vulgaris*, postignut je značajan napredak u kontroliranoj reprodukciji, hranidbi i uzgoju paralarvi (Iglesias i sur., 2014). Međutim, kod većine komercijalno važnih lignji i sipa, poput japanske leteće lignje *Todarodes pacificus*, tehnologija zatvorenog uzgoja još uvijek nije potpuno razvijena, pa se nasadni materijal i dalje često prikuplja iz divljih populacija, što dovodi do preklapanja interesa ribarstva i akvakulture (FAO, 1997).

Japan je pionir u sustavnom pristupu repopulaciji glavonožaca. U prefekturama kao što su Ehime, Nagasaki i Hokkaido provedeni su projekti koji kombiniraju više metoda:

Postavljanje umjetnih mrijestilišta — keramičke posude, betonske strukture i potopljene mreže služe kao substrati za odlaganje jaja hobotnica i sipa.

Puštanje mladi iz uzgoja — laboratorijski uzgojene jedinke puštaju se na odabrane lokacije s povoljnim ekološkim uvjetima.

Sezonske zabrane izlova — privremeno zatvaranje ribolovnih zona tijekom mrijesta, što omogućuje prirodno novačenje. **Praćenje i evaluacija** — korištenjem označavanja i telemetrijskog praćenja, te genetskih analiza prati se stopa povratnog ulova i utjecaj na strukturu populacije (Arimoto i sur., 2018).

Uspješni programi dokazuju da su stope povratnog ulova kod hobotnica mogle doseći i do 20 % puštenih jedinki, što ekonomski opravdava ulaganja, osobito u području s visokim tržišnim cijenama proizvoda (Yamashita i sur., 2005). No, rezultati variraju ovisno o kvaliteti staništa, gustoći predatora, oceanografskim uvjetima i provedbi pratećih mjera zaštite.

Vezano za repopulaciju glavonožcima prepoznata su i neka ograničenja i izazovi. Ograničenja repopulacije glavonožaca dijelom su slična onima kod drugih morskih organizama, a dijelom specifična za ovu skupinu:

Nepotpuna biotehnoška rješenja — zatvaranje životnog ciklusa moguće je samo za ograničen broj vrsta, dok je kod lignji i dalje u eksperimentalnoj fazi.

Visoki troškovi hranidbe — glavonošci su karnivori i zahtijevaju hranu bogatu proteinima, što povećava proizvodne troškove i stvara dodatni pritisak na druge riblje resurse (García García i sur., 2011).

Ekološka neizvjesnost — prirodna varijabilnost regrutacije otežava predviđanje rezultata, pa i planiranje uzgoja za potrebe repopulacije.

Ipak prepoznate su značajne mogućnosti perspektive i razvoja metoda repopulacije glavonošcima. FAO naglašava da repopulacija glavonožaca treba biti dio šire strategije integriranog upravljanja obalnim područjima, koja uključuje obnovu staništa, prilagođene mjere kontrole ribolovna i sudjelovanje lokalnih zajednica (FAO, 2020). Primjena japanskih iskustava, poput kombinacije umjetnih mrijestilišta i sezonskih zatvaranja, u Jadranu bi se mogla testirati kroz pilot-projekte za hobotnicu i sipu, uz obnovu livada Posidonije, *Posidonia oceanica*, na mekom dnu koja inače nisu pogodna za zadržavanje i deponiranje oplođenih jajašaca.

S obzirom na rastuću potražnju na domaćem i međunarodnom tržištu, značajnog pritiska gospodarskog i rekreacijskog ribolova, te relativno kratke životne cikluse ciljanih vrsta glavonožaca, glavno ograničenje ostaje u razvoju pouzdane tehnologije zatvorenog uzgoja. Uspjeh ovakvih programa ovisit će o interdisciplinarnoj suradnji biologa, uzgajivača, ribara i donositelja odluka, uz stalno praćenje bioloških i ekoloških, kao socioekonomskih pokazatelja.

1.2. Opis vrste i uzgojne tehnologije

1.2.1 Biološka i ekološka obilježja hobotnice

Svi današnji glavonošci, uključujući lignje, sipe i hobotnice, pripadaju podrazredu *Coleoidea* (Boyle i Rodhouse, 2006; Kröger i sur., 2011). Prema nalazima fosila i molekularnim istraživanjima, *Coleoidea* su se razvile zajedno sa sestrinskom skupinom *Nautiloidea* u kasnom paleozoiku, prije približno 276 milijuna godina, kada su, pod pritiskom kompeticije, zauzeli dublje dijelove vodenog stupca. Prilagodba na život pod utjecajem visokog hidrostatskog tlaka rezultirala je gubitkom vanjskog oklopa, što je značilo gubitak njegove zaštitne funkcije, ali i oslobađanje tijela od krutih ograničenja, čime je omogućeno zauzimanje bento-pelagičkih staništa (Kröger i sur., 2011). Povećana ranjivost na predatore nadoknađena je razvojem bržeg plivanja i veće pokretljivosti, što je iziskivalo povećanu potrošnju energije i ubrzanje metabolizma. Krvožilni sustav glavonožaca zatvorenog je tipa, s dva razgranata srca smještena

u bazi škrgi, čija je uloga poboljšati cirkulaciju unutar škrge i opskrbu kisikom, te s glavnim sistemskim srcem koje osigurava distribuciju krvi po cijelom tijelu. Takav sustav, zajedno s učinkovitijom ventilacijom škrgi, omogućio je razvoj snažne muskulature plašta i stvaranje komore za mlazni pogon — specifičnog oblika kretanja koji karakterizira ove životinje (Boyle i Rodhouse, 2006). Glavonožci su evolucijski razvili napredne složene osjetilne sustave, posebno oči, čija je građa i funkcija naprednija ili usporediva s građom oka viših kralježnjaka, te visoko razvijen mozak koji hobotnicama omogućuje iznimnu prilagodljivost, složene obrasce ponašanja i rješavanje problema (Nixon i Young, 2003). Tijelo hobotnice bogato je složenim osjetilnim strukturama koje joj omogućuju visoku osjetljivost i preciznost u interakciji s okolišem. Krakovi i pipci hobotnice opremljeni su brojnim receptorima za kemijske i taktilne podražaje, čime se osigurava izuzetna sposobnost prepoznavanja predmeta i hrane u neposrednoj blizini (Wells, 1978). Na pipcima se nalaze osjetilne stanice koje omogućuju hobotnici ne samo da "okusi" stvari dodiranjem već i da procijeni teksturu i oblik predmeta bez vizualne pomoći (Kier & Smith, 1985). Ovakva kombinacija kemijskih i mehaničkih osjetila doprinosi sofisticiranom načinu prikupljanja informacija, što hobotnicu čini uspješnim predatorom i istraživačem morskog okoliša (Budelmann, 1995). Novija istraživanja potvrđuju da hobotnice pokazuju oblike kognitivnih sposobnosti koji uključuju učenje promatranjem, prepoznavanje pojedinih jedinki i upotrebu predmeta kao alata, što ih svrstava među najinteligentnije morske beskralježnjake. Uzimajući u obzir sve veći broj dokaza o izrazito razvijenoj kogniciji kod mekušaca, provedena su brojna istraživanja s ciljem evaluacije neuroloških i ponašajnih svojstava hobotnica (*Octopus vulgaris* i srodne vrste). Eksperimentalna promatranja pokazala su da hobotnice posjeduju decentralizirani živčani sustav — više od 60% neurona nalazi se u krakovima, dok se ostatak raspoređuje u mozgu i optičkim reznjevima (Godfrey-Smith, 2016). Ovakva organizacija omogućava autonomno procesiranje informacija u kracima i neovisno izvršavanje zadataka, što je dokumentirano kroz manipulacijske eksperimente s objektima različitih struktura i otpornosti (Byrne et al., 2006). Za vrijeme testiranja sposobnosti rješavanja problema, korišteni su zadaci otvaranja kutija i manipulacije predmetima, gdje su hobotnice demonstrirale sposobnost prilagodbe ponašanja, memoriranja rješenja te donošenja alternativnih strategija u slučaju promjene uvjeta (Fiorito et al., 1990). Opservacijskim učenjem, koje je rijetkost kod beskralježnjaka, dokumentirana je mogućnost da hobotnice promatranjem drugih jedinki savladavaju diskriminacijske zadatke, što ukazuje na postojanje viših oblika procesiranja informacija (Kuba

et al., 2006). Snimanjem ponašanja pomoću kontinuirane video analize (npr. "GoPro Hero" kamera postavljena unutar akvarija) uočeno je postojanje tzv. individualnih stilova ponašanja, uključujući izraženu radoznalost, prepoznavanje objekata te čak oblik ponašanja nalik igri (Mather & Anderson, 1999). U uvjetima laboratorija, korištenjem neurofizioloških mjerenja i histoloških analiza, utvrđeno je da su vertikalni režanj i superiorni frontalni režanj mozga odgovorni za memorijske funkcije, s izraženom neurogenezom tijekom intenzivne kognitivne stimulacije (Shomrat et al., 2011). U sklopu ekoloških promatranja, neke vrste hobotnica, poput *Amphioctopus marginatus*, zabilježene su kako koriste alate — npr. polovice kokosovih ljuski za zaštitu — što je jedan od rijetkih primjera upotrebe alata kod beskralješnjaka (Finn et al., 2009). Takvo ponašanje jasno pokazuje planiranje unaprijed i svijest o vlastitom tijelu u prostoru. Dodatno, bilježeni su slučajevi međuvrsne suradnje, gdje hobotnice sudjeluju u koordiniranom lovu s ribama, izmjenjujući napade i pozicije, što sugerira kognitivnu fleksibilnost i sposobnost socijalnog procesiranja (Vail et al., 2013). U konačnici, promatrajući emocionalne reakcije hobotnica, uključujući izbjegavanje bolnih podražaja, promjene boje tijela i bihevioralne inhibicije, znanstvena zajednica sve više prepoznaje potencijalnu sentijentnost (osjećajnost) kod ove skupine životinja, što ima direktne etičke implikacije za uzgoj i eksperimentalni rad (Birch et al., 2021).

Jedna od najprepoznatljivijih prilagodbi, osobito izražena kod hobotnica, jest mimikrija — sposobnost trenutne promjene boje i uzorka tijela radi izbjegavanja predatora ili maskiranja tijekom lova (Slika 2). Promjena boje temelji se na stezanju i rastezanju kromatofora pomoću posebnih mišićnih stanica, a proces je pod izravnom kontrolom živčanog sustava (Matoničkin, 1998). Uz kromatofore, u promjenu vizualnog dojma uključene su i druge strukture poput iridofora i leukofora, koje omogućuju modulaciju boje, kontrasta i refleksije svjetlosti. Druga učinkovita obrambena strategija jest ispuštanje crnila iz vrećice smještene s ventralne strane trbušnih organa, čime hobotnica u opasnosti stvara gust oblak koji zbunjuje napadača. Crnilo, bogato tirozinom, može iritirati oči i privremeno onemogućiti osjet njuha predatora (Franetović, 2002).



Slika2 Hobotnica kamuflirana u pijesak (izvor: [https://www.telegraph.co.uk/news/picturegalleries/earth/3247746/Animals-disappearing-using-camouflage.html?image=7The Telegraph](https://www.telegraph.co.uk/news/picturegalleries/earth/3247746/Animals-disappearing-using-camouflage.html?image=7The+Telegraph)).

1.2.2. Morfološka obilježja i reprodukcija

Hobotnica (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) bentoska je vrsta koja nastanjuje područje od same obale do vanjskog ruba kontinentalnog šelfa, na dubinama od 0 do 200 metara, a obitava u raznovrsnim staništima poput stjenovitih obala, koraljnih grebena i livada morskih cvjetnica. Kao stenohalina vrsta izostaje u brakičnim područjima, a pad temperature mora ispod 7 °C dovodi do usporavanja metabolizma i smanjene aktivnosti. Tijelo joj je bilateralno simetrično, mišićavo, s osam krakova koji mogu doseći duljinu do 3 metra, na kojima se nalaze prianjaljke raspoređene u dva niza. Kod mužjaka je treći desni krak hektokotiliziran — na vrhu preobražen u žličasti izdanak (ligulu) koji služi pri kopulaciji (Slika 3).



Slika 3. Hektokotilizirani krak mužjaka hobotnice na lijevoj slici lijevi krak, na slici desno spolni dimorfizam kod hobotnice hektokotil u bijelom okviru i veće prijanjaljke na krakovima u crvenim okvirima. (Izvor: Leon Grubišić).

Razmnožavanje hobotnice klasificira se kao simultano terminalno, a vrsta je semelparna, s unutarnjom oplodnjom (Roper i sur., 1983). Spolno sazrijevanje obično nastupa između 12. i 18. mjeseca starosti, a ženka se razmnožava samo jednom (Rocha i sur., 1999). U Sredozemnom moru zabilježena su dva glavna perioda mrijesta, u razdoblju od travnja do lipnja, te u listopadu. Hobotnice su vrlo plodne. Ženke mogu proizvesti od 100 000 do 500 000 jaja (Mangold, 1983), koja odlažu u obliku grozdova na zaklonjenim površinama unutar odabranog skloništa. Tijekom reproduktivne sezone zabilježena su različita ponašanja mužjaka i ženki hobotnica, koja uključuju promjene u boji tijela, pokrete krakova te prostorne interakcije. Ženke hobotnica u određenim vrstama pokazuju selektivnost prema potencijalnim mužjacima, što se tumači kao oblik odabira partnera temeljen na veličini, ponašanju ili genetskoj raznolikosti (Huffard, 2005). Kopulacija započinje kada mužjak specijaliziranim krakom, tzv. hektokotilom, prenese spermatofores – kapsulirane pakete sperme – u ženski plašt, gdje ih pohranjuje u jajovodu do trenutka oplodnje (Norman, 2000). U nekim slučajevima zabilježena je i udaljena oplodnja, pri čemu mužjak umetne hektokotil u ženku s određene distance, čime smanjuje rizik od agresije (Hanlon & Messenger, 1996). Reproductivni čin kod hobotnica često je popraćen složenim ponašanjima i taktičkim prilagodbama koje variraju među vrstama i ovisno o okolišnim čimbenicima. Spolno zrela ženka hobotnice tijekom kopulacije prikuplja spermatofores jednog ili više mužjaka, koje se

pohranjuju u posebne spremnike unutar plašta. Do oplodnje, međutim, ne dolazi odmah nakon prijenosa spermatofora. Ženka sama regulira vrijeme kada će iskoristiti pohranjeni reproduktivni materijal, a proces oplodnje može uslijediti i nakon nekoliko dana ili tjedana, ovisno o okolišnim uvjetima i fiziološkoj spremnosti za polaganje jaja (Hanlon & Messenger, 1996; Boyle & Rodhouse, 2005). Ova odgođena oplodnja smatra se oblikom ženske reproduktivne kontrole, a omogućava ženki da optimizira vrijeme i mjesto polaganja jaja u svrhu maksimalne zaštite potomstva (Naud et al., 2005). Nakon uspješne oplodnje, ženka hobotnice povlači se u zaštićeni prostor, najčešće u udubljenje ili špilju na morskom dnu, gdje započinje proces polaganja jaja. Jaja su pojedinačno obavijena prozirnim ovojem i polažu se u skupinama, koje ženka pažljivo pričvršćuje za tvrdi podlogu, obično na strop ili zidove skloništa (Norman, 2000). Tijekom cijelog razdoblja inkubacije, koje može trajati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci, ženka ne napušta gnijezdo. Aktivno propušta svježu morsku vodu preko jaja pomoću mlaznog plašta i pokreta krakova, osiguravajući potrebnu ventilaciju i kisik (Boal, 2006). Istodobno, uklanja ostatke, sediment i jaja koja pokazuju znakove propadanja, čime smanjuje rizik od infekcija i povećava šanse za preživljavanje potomstva (Hanlon & Messenger, 1996). Tijekom tog perioda ženka prestaje s hranjenjem, troši vlastite tjelesne rezerve i, u pravilu, ugiba neposredno nakon izlijeganja mladunaca.

Tijekom inkubacije, koja traje od četiri do dvanaest tjedana, ženke se ne hrane niti napuštaju sklonište, što rezultira njihovom smrću nakon izvaljivanja mladih (Iglesias i sur., 2000).

Netom nakon izvaljivanja, jedinke hobotnice prolaze planktonsku fazu u obliku paraličinki duljine plašta oko 2 mm (Boletzky, 1987). Taj stadij traje približno osam tjedana pri temperaturi od 21 °C (Villanueva, 1995), a paralarve se hrane zoeama rakova *Liocarcinus depurator*, *Pagurus prideaux* i *Eriphia verrucosa* (Cinoti, 2007). Prelazak na bentoski način života događa se kada jedinke dosegnu duljinu plašta od 7,5 mm (slika 4.), neovisno o temperaturi mora (Villanueva, 1995; Cinoti, 2007). Posljednja istraživanja upućuju na to da klimatske promjene i porast temperature mora mogu skratiti trajanje planktonske faze, što može utjecati na obrasce disperzije i strukturu populacija.



Slika 4. Makrofotografija paraličinki hobotnice različite starosti (Izvor. Leon Grubišić)

1.1.3. Prehrana i ponašanje

Hobotnica je izraziti predator (Mather i O'Dor, 1991) koji svoj plijen pronalazi vizualno, nasumičnim pretraživanjem krakovima ili ispuhivanjem mlaza vode kako bi otkrila zakopane organizme. Posjeduje kemoosjetilne stanice na usnom polju i prijanjaljkama (Budelmann, 1996), koje koristi za socijalnu komunikaciju i detekciju plijena na udaljenosti. Preferira živu hranu, no u zatočeništvu se može prilagoditi i na mrtvu hranu poput komadića rakova, riba ili mekušaca. Najveća aktivnost zabilježena je u noćnim satima i u vrijeme sumraka (Boucaud-Camou i Boucher-Rodoni, 1983), a vrsta pokazuje izraženi negativan fototaksizam. U uvjetima zatočeništva opažene su razlike u individualnom ponašanju, što ukazuje na postojanje određenih „osobnosti” kod hobotnica, uključujući varijacije u razini istraživačkog ponašanja, agresivnosti i tolerancije na prisutnost drugih jedinki.

1.1.4. Uzgoj i repopulacija

Prvi pokušaji industrijskog uzgoja hobotnice u plutajućim kavezima započeli su krajem 1990-ih godina (Iglesias i sur., 2000). Danas se u Španjolskoj postižu stope rasta od 0,3 do 0,8 kg mjesečno, uz smrtnost od 5,7 %, a hobotnice se hrane odmrznutim srdelama (*Sardina pilchardus*), bukvama (*Boops boops*), skušama (*Scomber scombrus*) i dagnjama (*Mytilus sp.*). Preporučuje se razdvajanje spolova kako bi se spriječila kopulacija, budući da neosjemenjene ženke rastu brže i bolje iskorištavaju hranu. Optimalna temperatura mora za rast je između 16 i 21 °C, s prosjekom od 17,5 °C. Sve veći interes izaziva uzgoj u recirkulacijskim sustavima akvakulture (RAS), koji omogućuju potpunu kontrolu temperature, saliniteta i kvalitete vode te potencijalno omogućuju cjelogodišnji uzgoj i kontrolirano razmnožavanje.

S obzirom na problem prelova i potrebu očuvanja prirodnih populacija, razvijen je koncept repopulacije ispuštanjem nedoraslih jedinki u more (Casalini i sur., 2020). Stopa preživljavanja može se znatno povećati odabirom područja s manjim brojem predatora ili ispuštanjem u razdoblju smanjene predatorske aktivnosti (Blankenship i Leber, 1995). Međutim, pretjerano ispuštanje može nepovoljno utjecati na matični stok, kao što je zabilježeno kod kozica *Penaeus japonicus* i *P. chinensis* u Japanu i Kini (Hamasaki i Kitada, 2006; Wang i sur., 2006a).

Uspješnost repopulacije ovisi o razumijevanju ekologije ciljne vrste, procjeni nosivog kapaciteta ekosustava i prirodne smrtnosti, a programi moraju biti društveno prihvatljivi, gospodarski isplativi i ekološki održivi (Bell i sur., 2005; Devin i Johann, 2008). Ključni koraci uključuju procjenu statusa populacije, modeliranje koristi od ispuštanja, edukaciju ribara i stalno praćenje rezultata. Hobotnica se pritom promatra ne samo kao vrijedan gospodarski resurs već i kao važan element morskih ekosustava, čije očuvanje može imati dugoročne pozitivne učinke na bioraznolikost i održivost ribolova.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Svrha ovog istraživanja jest prikaz i analiza rezultata koji se odnose na mogućnost prikupljanja i dugotrajnog održavanja matičnog jata hobotnica (*Octopus vulgaris*) temeljenog na ciljanom ulovu nedoraslih jedinki iz prirodnih populacija i njihovom uzgoju u kontroliranim uvjetima. Istraživanje je usmjereno na ispitivanje tehničkih, bioloških i logističkih aspekata ovog procesa, pri čemu je krajnji cilj bio procijeniti održivost uspostave zatvorenog uzgojnog ciklusa, što uključuje i repopulaciju ciljane vrste u prirodnom okolišu. Poseban naglasak stavljen je i na izradu **praktičnog priručnika** koji će objediniti sve rezultate i preporuke te služiti kao vodič za buduće aktivnosti u uzgoju hobotnice.

Pritom su definirani sljedeći specifični ciljevi:

- Utvrditi mogućnost ulova i transporta živih hobotnica do uzgojnog postrojenja, uz očuvanje visoke stope preživljavanja i minimaliziranje stresa kod jedinki.
- Istražiti mogućnost dugotrajnog održavanja matičnog jata u kontroliranim uvjetima mrijestilišta, uključujući prilagodbu jedinki na zatočeništvo.
- Testirati hranidbene strategije matičnog jata temeljene na sitnoj pelagičkoj ribi, uz evaluaciju utjecaja na kondicijsko stanje i reproduktivnu sposobnost jedinki.
- Provjeriti izvedivost hranjenja i uzgoja paralarvi hobotnice od izvaljivanja do prijelaza na bentoski način života.
- Procijeniti uspješnost repopulacije putem ispuštanja juvenilnih jedinki u more te pratiti njihov opstanak i integraciju u prirodne populacije.
- Izraditi priručnik za uzgoj matičnih jedinki hobotnice, s detaljnim opisom svih koraka postupka, uključujući metode uzgoja najranijih faza paralarvi za potrebe repopulacije.

Ovi ciljevi proizlaze iz potrebe za pronalaskom alternativnih i održivih modela iskorištavanja resursa glavonožaca, s naglaskom na očuvanje matičnog stoka i smanjenje pritiska ribolova na prirodne populacije. Izrada priručnika osigurava da rezultati istraživanja ne ostanu samo u znanstvenom okviru, već budu dostupni i primjenjivi u praksi, čime se stvara temelj za daljnji razvoj održive akvakulture hobotnice.

5. MATERIJALI I METODE

2.1. Prikupljanje matičnog jata

Istraživanje obuhvaća rezultate dviju zasebnih terenskih kampanja provedenih tijekom 2019, 2020 i 2023 godine. Prvo prikupljanje provedeno je u veljači 2019. godine u akvatoriju južne strane otoka Brača, na lokalitetima uvale Smrka, uvale Lučice i uz obalu Rta Kobila. Za potrebe ovog posla angažirani su lokalni ribari iz Milne, čije iskustvo u poznavanju ribolovnih terena i ponašanja ciljne vrste značajno doprinosi učinkovitosti lova.

Za lov živih hobotnica korišten je isključivo ribolovni alat poznat pod nazivom panula. Panula je jednostavne konstrukcije i sastoji se od motovila s namotanom monofilamentnom strunom promjera 2 mm, na čijem je slobodnom kraju postavljen mamac te olovno otežanje. Kao mamci su se, ovisno o dostupnosti i vremenskim prilikama, koristile različite vrste sitne ribe, pri čemu su u drugom prikupljanju (ožujak 2020.) najčešće korištene bukva (Boops boops) i šarun (*Trachurus trachurus*) (Slika 5).



Slika 5. Panula za lov hobotnica, mamac i uteg od nekoliko karika metalnog lanca.

Drugo prikupljanje provedeno je 13. ožujka 2020. godine istraživačkom motornom brodicom „Navicula“ Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, u istom akvatoriju i na istim lokalitetima. Metodologija lova bila je u potpunosti identična prvoj kampanji, kako bi se osigurala usporedivost rezultata.

Lov je organiziran tako da bi dvoje članova posade, smještenih na krmi broda, povlačilo panulu po morskom dnu, ciljajući dubine između 5 i 20 metara. Brzina povlačenja prilagođavala se uvjetima na terenu — minimalno korištenje pogonskog motora ili oslanjanje na prirodno kretanje broda pod utjecajem lokalnih morskih struja i vjetra. Nakon što bi se hobotnica prihvatila za mamac, slijedilo je lagano ručno povlačenje do površine, a zatim izvlačenje iz mora pomoću janke. Ulovljene hobotnice odmah su odvajane u pojedinačne vreće izrađene od mrežnog tega te smještane u transportni bazen (Slika 6). Ovakav način odvajanja sprječava bijeg jedinki, mehanička oštećenja i eventualnog gubitaka zbog kanibalizma. Tijekom transporta more u bazenu izmjenjivalo se u redovitim intervalima od jednog sata, čime se održavala kvaliteta vode, osiguravao kisik i smanjivao stres kod životinja. Ova metoda omogućila je visoku stopu preživljavanja unatoč duljem vremenu ribolova i transporta. Transport od Brača do eksperimentalnog mrijestilišta Instituta u Splitu obavljen je istom brodicom „Navicula“.



Slika 6. Transportni bazen s hobotnicama odvojenima u vrećama od mrežnog tega (Izvor: I. Grubišić).

2.2. Određivanje mase i spola

Po dolasku u mrijestilište, svaka je hobotnica obuhvaćena biometrijskom obradom koja je obuhvaćala mjerenje mase, određivanje spola te uzimanje manjeg uzorka tkiva za potrebe genetičke analize. Postupak je proveden u skladu s načelima dobrobiti životinja, uz minimaliziranje boli i stresa. U tu svrhu korištena je metoda sedacije hlađenjem — u posudu s morskom vodom dodani su smrznuti ulošci, a nakon što se temperatura spustila na 3 °C, hobotnice su smještene u posudu, gdje su se u roku od nekoliko minuta sedirale.

Spol je određen vizualnim pregledom krakova, pri čemu se kod mužjaka jasno prepoznaje hektokotilizirani treći desni krak od oka. Uzorak tkiva uzet je kirurškim nožićem s dijela kraka i pohranjen u 95 %-tnom etanolu do analize. Za mjerenje mase korišteni su plastični kavezi uniformne mase; masa jedinki dobivala se iz razlike mase kaveza s hobotnicom i mase praznog kaveza. Redovita mjerenja provodila su se u razmacima od dvadeset dana, s

ciljem praćenja promjena u kondiciji i rastu jedinki tijekom eksperimentalnog razdoblja (Slika 7).



Slika 7. Vaganje hobotnica na početku uzgojnog ciklusa (izvor: L.Grubišić).

2.3. Održavanje matičnog jata hobotnica zatvorenog tipa

Eksperimentalno održavanje matičnog jata hobotnica provedeno je u kružnim bazenima zapremine 12 m³, posebno prilagođenima za potrebe ovog istraživanja. U svaki je bazen bilo smješteno šest jedinki istog spola, raspoređenih unutar pravokutnih plastičnih kaveza (Slika 10). Ovakav raspored nije odabran slučajno — iskustvo iz prethodnih pokušaja uzgoja hobotnica pokazuje da prostorna separacija jedinki unutar zajedničkog sustava značajno smanjuje stres i incidenciju agresivnog ponašanja, uključujući i kanibalizam, koji može ozbiljno kompromitirati održivost matičnog jata.

Sustav zatvorenog tipa osiguravao je stabilnu opskrbu svježom morskom vodom, pri čemu se ukupni volumen bazena izmjenjivao pet puta dnevno. Takva učestalost izmjene vode

nije samo tehnički detalj, već ključni element očuvanja optimalnih uvjeta za preživljavanje i dobrobit hobotnica, posebno kada se radi o dugotrajnom uzgoju.

Tijekom cijelog istraživanja, svakodnevno su se pratili abiotički parametri uzgojne sredine, prije svega temperatura mora i koncentracija otopljenog kisika. Kontrola ovih varijabli nužna je jer promjene u temperaturi i dostupnosti kisika mogu izazvati brze i ponekad nepovratne fiziološke reakcije kod glavonožaca, uključujući smanjenje apetita i povećanu smrtnost.

Kavezi u kojima su bile smještene hobotnice imali su gustu mrežastu strukturu s brojnim perforacijama koje su omogućavale nesmetan protok vode, a gornji se poklopac mogao jednostavno otvoriti za potrebe hranjenja i uklanjanja nepojedene hrane (Slika 11). Time je postignut balans između fizičke zaštite jedinki i jednostavnog pristupa istraživača tijekom svakodnevnih operacija.



Slika 10. Bazeni s kavezima u kojima su bile smještene ženske jedinke, i odvojeni bazen u kojem su bili mužjaci. a na desnoj bazen s kavezima u kojima su bili mužjaci.



Slika 11. Plastični kavez s hobotnicom i pokrovom.

2.4. Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima

Hranidbeni režim temeljen je na upotrebi sitne pelagičke ribe, i to prvenstveno srdele (*Sardina pilchardus*) i inćuna (*Engraulis encrasicolus*), vrsta koje su u Jadranu i komercijalno i ekološki značajne, a uz to nutritivno pogodne za hobotnice. Visok udio proteina i omega-3 masnih kiselina u njihovim tkivima čini ih iznimno prikladnom hranom za poticanje rasta i održavanje reproduktivne kondicije.

Riba je u najvećem dijelu nabavljena s broda plivarice od lokalne ribarske tvrtke Sardina d.o.o. Zbog zadržavanje hranidbene vrijednosti odmah je po preuzimanju pohranjena na -20 °C kako bi se spriječila degradacija hranjivih tvari. Prije hranjenja, smrznuta riba odmrzavala se u tekućoj morskoj vodi, a zatim precizno vagala za svaku jedinku zasebno. Ovakva individualizacija obroka omogućila je precizno praćenje konzumacije, te naknadno izračune parametara ishrane (slika 12).



Slika 12. Precizno vaganje porcija pelagičke ribe za hranjenje hobotnica.

Nakon svakog hranjenja, nepojedeni dijelovi obroka uklanjali su se iz kaveza i vagali kako bi se utvrdila stvarna količina konzumirane hrane. Ovaj metodološki pristup bilo je ključan za izračun parametara kao što su masa probavljene hrane (IF), apsolutna i specifična stopa hranjenja (AFR, SFR), efikasnost hranjenja (FE) te indeks konverzije hrane (FCR), prema metodologiji Ricker (1979). Praćenje tih pokazatelja daje uvid ne samo u energetske učinkovitost ishrane, već i u potencijalnu isplativost komercijalnog uzgoja hobotnica.

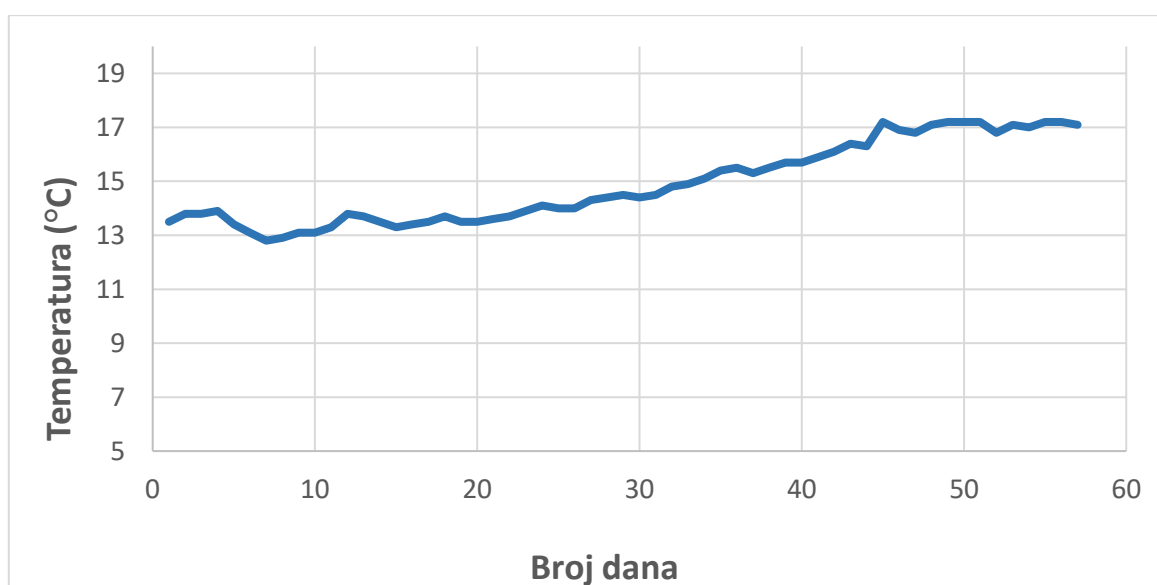
Pokus s hranjenjem je trajao od 17. ožujka do 12. svibnja 2020. godine, svakodnevno u isto vrijeme, osim vikendom i tijekom dana kada se provodila biometrija.

2.5. Rast hobotnica u kontroliranim uvjetima

Praćenje rasta morskih organizama jedan je od temeljnih elemenata svake uzgojne studije, a kod glavonožaca ima posebnu važnost jer se njihova tjelesna masa može značajno mijenjati u kratkom vremenskom razdoblju. Rast hobotnica u ovom istraživanju kvantificiran je pomoću tri standardna pokazatelja: prirasta mase (BWI), specifične stope rasta (SGR) i apsolutne stope rasta (AGR), prema metodologiji Sparre i Venema (1998). Analiza ovih parametara omogućila je preciznu procjenu uzgojnog potencijala i usporedbu s rezultatima drugih studija provedenih u sličnim uvjetima.

2.6. Ekološki uvjeti za vrijeme održavanja matičnog jata

Temperatura mora, jedan od ključnih okolišnih parametara za preživljavanje i reprodukciju hobotnica, praćena je tijekom cijelog razdoblja istraživanja analognim termometrom. Od ožujka do svibnja 2020. temperatura se kretala od 12,8 °C do 17,2 °C, s prosjekom od $14,9 \pm 1,48$ °C (Slika 13). Takav temperaturni raspon u skladu je s prirodnim sezonskim oscilacijama u istočnojadranskom priobalju, a blagi porast temperature prema kraju istraživanja mogao je poslužiti kao prirodni okidač za početak reproduktivnog ciklusa.



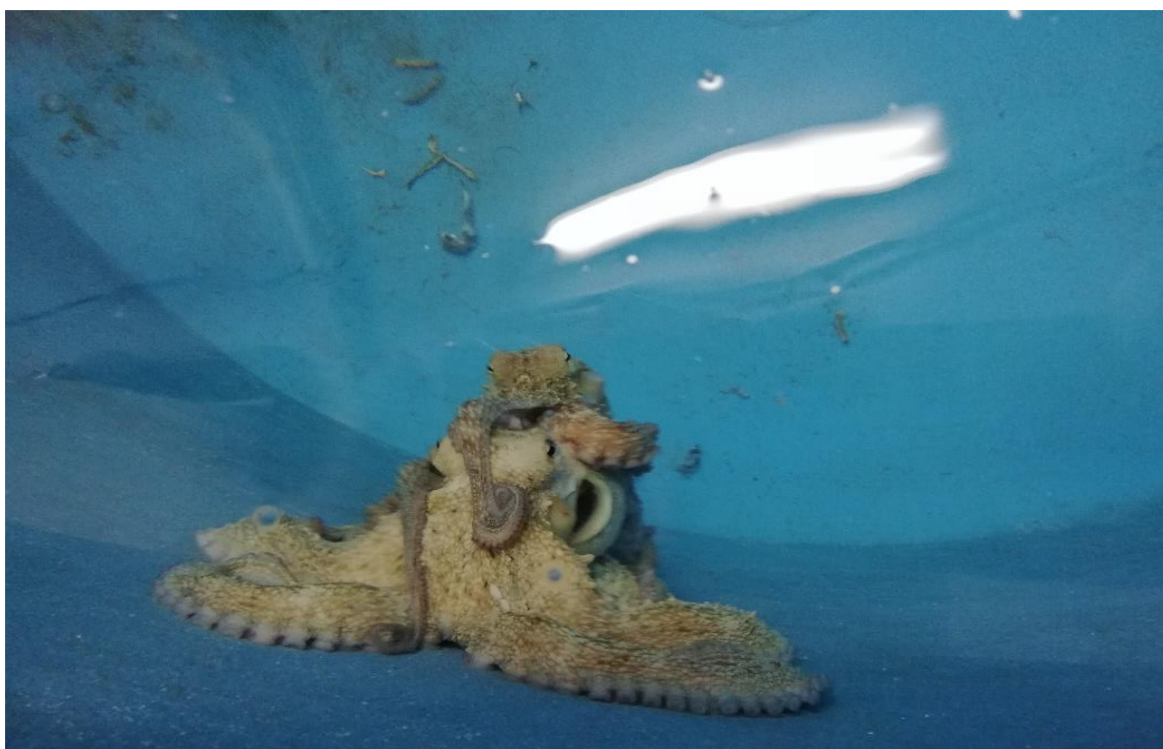
Slika 13. Kretanje temperature mora u bazenima tijekom istraživanja.

2.7. Reprodukcija u eksperimentalnim uvjetima

Nakon šezdesetodnevnog razdoblja prilagodbe i održavanja u zatvorenom sustavu, ženke su premještene iz plastičnih kaveza u veće, kružne bazene zapremine 12 m³. Premještanje je provedeno s ciljem omogućavanja uvjeta pogodnijih za prirodno ponašanje i poticanje reproduktivnog ciklusa. U svaki bazen postavljene su polipropilenske cijevi duljine jednog metra i promjera 22 cm, koje su s jedne strane bile zatvorene, a s druge otvorene. Zidovi cijevi perforirani su otvorima promjera 20 mm, čime je osigurana stalna cirkulacija svježih morske vode unutar skloništa.

Ove su cijevi imale ključnu ulogu u stvaranju sigurnog i skrovitog prostora za ženke, gdje su se mogle skloniti, smanjiti izloženost stresu i, po uspješnoj kopulaciji, odložiti jaja. Način postavljanja skloništa temeljen je na opažanjima iz prirodnog okoliša, gdje hobotnica odabire pukotine, šupljine ili prostore ispod stijena za polaganje i čuvanje jaja.

Kopulacija je poticana ubacivanjem mužjaka u bazen sa ženkama, pri čemu je opažano ponašanje karakteristično za ovu vrstu, uključujući ubacivanje hektokotiliziranog kraka mužjaka u plašt ženke (Slika 14). S obzirom na izraženi kanibalizam kod hobotnica, posebno nakon kopulacije, mužjaci su odmah po završetku parenja uklanjani iz bazena i vraćeni u svoje kaveze. Ova mjera bila je nužna za očuvanje ženki i sprječavanje gubitaka.



Slika 14. Prikaz ubacivanja hektokotiliziranog kraka mužjaka u tijelo ženke tijekom kopulacije.

2.8. Hranjenje, održavanje i puštanje paraličinki u more

Tijekom istraživanja provedenog 2019. godine zabilježena je uspješna kopulacija, a početkom lipnja ženke su počele polagati jaja u obliku grozdova unutar pripremljenih skloništa. Tijekom cijelog perioda inkubacije ženke nisu napuštale skloništa, prestale su se hraniti ponuđenom hranom i intenzivno su čuvale jaja, ventilirajući ih pokretima krakova i ispuhivanjem mlazova morske vode kroz sifon. Zabilježeno ponašanje u potpunosti odgovara poznatim obrascima majčinske brige kod hobotnice, ali nažalost, završava uginućem ženke neposredno nakon izvaljivanja paraličinki.

Tri ženke u ovom istraživanju imale su uspješnu oplodnju. Njihovi su bazeni pretvoreni u bazene za uzgoj paraličinki, čime je omogućeno kontinuirano praćenje razvoja potomstva. Odvodna cijev bazena je prekrivene planktonskom mrežicom veličine oka 1mm, a značajno je smanjen i protok morske vode. Za biometrijsku analizu i fotografiranje, paraličinke su sedirane dodavanjem ohlađene morske vode u Petrijeve posude. Fotodokumentacija je provedena uz pomoć stereo lupe ZEISS Discovery V12 s fotoaparatom ZEISS AxioCam ERc i izvorom hladnog svjetla ZEISS CL 1500 HAL.

Uzorci izvaljenih paraličinki pohranjeni su za genetsku analizu s ciljem testiranja informativnosti mikrosatelitnih biljega u postupcima utvrđivanja očinstva (populacija 19F1_P).

Hranjenje je organizirano na način da je svaka paraličinka imala pristup ranim razvojnim stadijima raka žbirca (*Eriphia verrucosa*), koji su predstavljali visoko nutritivnu živu hranu. Kako bi se osigurala stalna dostupnost zoe, u svakom je bazenu s paraličinkama bila smještena ženka žbirca s jajima (Slika 15). Unatoč tome, zabilježen je i kanibalizam među paraličinkama, što je poznat izazov u njihovom uzgoju. Nakon završetka eksperimentalnog uzgoja, sve su preostale paraličinke puštene u akvatorij u blizini Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. U istraživanju provedenom 2020. godine, unatoč sličnim uvjetima, nije došlo do uspješne reprodukcije matičnog jata. Na temelju dobivenih spoznaja u 2023. godini

izvršeno je prikupljanje matičnih jedinki zbog mrijesta i repopulacije dobivenim paraličinkama hobotnica.



Slika 15. Ženka žbirca s jajašcima netom prije izvaljivanja zoa (Izvor: Lovre Stanić).

2.9. Prikupljanje jedinki za provjeru uspješnosti repopulacije

Kako bi se procijenila učinkovitost repopulacije, 5. prosinca 2019. i 2. siječnja 2020. provedeno je ciljano prikupljanje hobotnica na području ispuštanja paraličinki, kao i na udaljenim lokacijama od tog mjesta u smjeru dominantnog strujanja mora. Uzorkovanje je obuhvatilo više lokacija: akvatorij ispred Instituta za oceanografiju i ribarstvo (IOR), obalni pojas uz Vilu Dalmacija (VD), plaže Kaštelet (Ka), Kašjuni (K), obalu uz Katalinića brijeg (KB), Žnjan (Ž) te istočni rt otoka Čiova (Č).

Ukupno je ronjenjem sakupljeno 23 jedinke različite veličine, koje su potom podvrgnute genetskoj analizi očinstva kako bi se utvrdilo jesu li potomci jedinki iz eksperimentalnog mrijestilišta. Podaci o svakoj jedinki — uključujući masu, datum i lokaciju ulova — prikazani su u Tablici 1.

Tablica 3. Podatci o prikupljenim uzorcima hobotnice (*O. vulgaris*) uključeni u istraživanje (broj uzoraka, lokacija uzorkovanja, period uzorkovanja i odgovarajuće mase uzorkovanih jedinki) (Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu; IOR, Vila Damacija; VD , plaža Kaštelet; Ka, plaža Kašjuni; K, Katalinić brijeg; KB, plaža Žnjan; Ž i rt otoka Čiova; Č)

Broj uzoraka	Populacijska oznaka jedinke	Period	Lokacija	Masa
1	19F1_O_01	05.12.2019.	IOR	4 kg
2	19F1_O_02	05.12.2019.	VD	1,7 kg
3	19F1_O_03	05.12.2019.	KA	2 kg
4	19F1_O_04	05.12.2019.	K	1,4 kg
5	19F1_O_05	05.12.2019.	K	2,3 kg
6	19F1_O_06	05.12.2019.	K	1,6 kg
7	19F1_O_07	05.12.2019.	IOR	1,5 kg
8	19F1_O_08	05.12.2019.	Č	4 kg
9	19F1_O_09	05.12.2019.	Č	0,6 kg
10	19F1_O_10	05.12.2019.	Č	1 kg
11	19F1_O_11	05.12.2019.	Č	0,9 kg
12	19F1_O_12	05.12.2019.	Č	0,8 kg
13	19F1_O_13	05.12.2019.	Č	1,6 kg
14	19F1_O_14	05.12.2019.	Č	2,4 kg
15	19F1_O_15	05.12.2019.	Č	2 kg
16	20F1_O_01	02.01.2020.	Ž	4 kg
17	20F1_O_02	02.01.2020.	KB	6 kg
18	20F1_O_03	02.01.2020.	K	2 kg
19	20F1_O_04	02.01.2020.	K	1,3 kg
20	20F1_O_05	02.01.2020.	K	3 kg
21	20F1_O_06	02.01.2020.	K	1 kg
22	20F1_O_07	02.01.2020.	K	3 kg
23	20F1_O_08	02.01.2020.	K	3 kg
Populacijska oznaka jata		19F1_O		

2.10. DNK izolacija

DNK je izolirana pojednostavljenim postupkom izolacije sisavaca prema Laird i sur. (1991), prilagođenom za tkiva hobotnice. Tkivo je najprije isprano destiliranom vodom kako bi se uklonio alkohol, a zatim inkubirano preko noći u 300 μ l lizirajućeg pufera s dodatkom 4 μ l proteinaze K u termomikseru na 55 °C, dok se tkivo nije razgradilo. Nakon toga dodan je jednak volumen fenol/kloroforma, koji omogućuje uklanjanje proteina, te je uzorak centrifugiran (13 000 K, 5 min). Time su dobivene dvije frakcije: gornja, koja je sadržavala DNK, pažljivo je prenesena u novu epruvetu, dok je donji talog s proteinima odbačen. U gornju frakciju dodan je dvostruki volumen 96 %-tnog etanola radi taloženja DNK, nakon čega je uzorak ponovno centrifugiran (13 000 K, 15 min). Dobiveni pelet ispiran je s 500 μ l 70 %-tnog etanola te ponovno centrifugiran (13 000 K, 5 min). Nakon uklanjanja alkohola, uzorci su ostavljeni da se osuše. Suhi talog potom je otopljen u 20–40 μ l TE pufera, ovisno o količini dobivene DNK.

Količina i kvaliteta DNK provjerene su spektrofotometrijski pomoću uređaja Nanophotometer IMPLEMEN P 360. Na temelju izmjerenih vrijednosti svi uzorci razrijeđeni su na radnu koncentraciju od 15 ng/ μ l i pohranjeni na –20 °C do daljnje uporabe.

2.11. Genotipizacija mikrosatelitnih biljega

2.11.1. Izbor mikrosatelitnih biljega

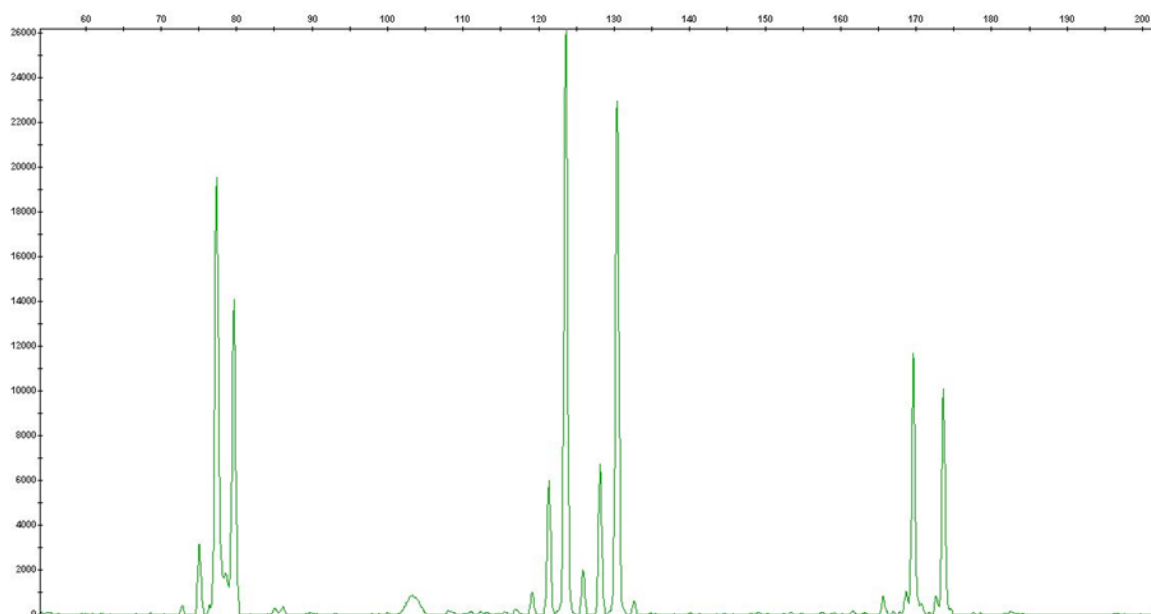
Za genetsku karakterizaciju uzoraka korištena su dva multiplex seta PCR reakcija (Ovul1 i Ovul2), specifična za *O. vulgaris*, koja obuhvaćaju ukupno šest mikrosatelitnih biljega prema Greatorex i sur. (2000) i Zuo i sur. (2012). Svaki biljeg označen je fluorescentnim bojama (crvena (PET), plava (FAM), zelena (VIC) i crna (NED)) radi lakše detekcije iste veličinske fragmente u genetičkom analizatoru. Opis svih lokusa, raspona alela i izvora prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Opis istraživanih mikrosatelitnih lokusa, fluorescentne boje i kombinacija početnica korištenih u dvi multiplex PCR reakcije (Ovul1, Ovul2), ponavljajući motiv, broj alela i izvor za svaki mikrosatelitni biljeg.

Multiplex PCR	LOKUS	PRISTUPNI BROJ GenBank	Uzvodna i nizvodna početnica	Boja	Motiv	Raspon (bp)	Broj alela	Izvor
Ovul1	Ovul09	JN579698	F: GGAAGGAATAAGAACAGAGAACG	6-FAM	Di	365–377	24	Zuo et al. 2012
			R: ATCTCTAATCTTCATTGCGTCTAA					
	uOct4	AF197131	F: AGGGAGAGAAAATAGAAAAC	VIC	Di	160	22	Greatorex et al. 2000
			R: TAAACTGAATAATACATACATACG					
	Ovul17	JN579706	F: GCAGGGCGAACAGATGAC	NED	Di	350–362	11	Zuo et al. 2012
			R: GCGTGCCTTTGGGTTCTC					
Ovul2	Ovul08	JN579697	F: CCGTCAGATTATGCCAACAC	6-FAM	Di	307–335	6	Zuo et al. 2012
			R: GCGAGTGAAGGGGAAGTAGA					
	uOct8	AF197130	F: CTCCTAGTTTGAATCACG	NED	Di	147	31	Greatorex et al. 2000
			R: GCCACTAATACACTTTCAAGG					
	uOv12	AF197135	F: GCATAATGTGCCGCTAAATGGAAC	PET	Tetra	269–341	17	Greatorex et al. 2000
			R: GCCTCGTCGGTATTTCTCTTTCA					

2.11.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR amplifikacija provedena je u ukupnom volumenu od 11 µl, prema protokolu koji uključuje inicijalnu denaturaciju, 27 ciklusa umnožavanja i završno produljenje. Dobiveni PCR produkti poslani su na sekvenciranje u laboratorij MacroGen, gdje su analizirani na ABI3730xl DNA Analyzeru. Visine i veličine alela očitane su pomoću softverskog paketa GeneMapper v. 3.5 (Slika 16).



Slika 16. Prepoznati fragmenti lokusa u GeneMapper 4.0 nakon elektroforeze.

2.12. Statistička analiza podataka

Podaci o rastu, hranidbi i drugim uzgojnim parametrima analizirani su u programu Microsoft Excel, dok su mikrosatelitni podaci obrađeni u specijaliziranim softverskim paketima.

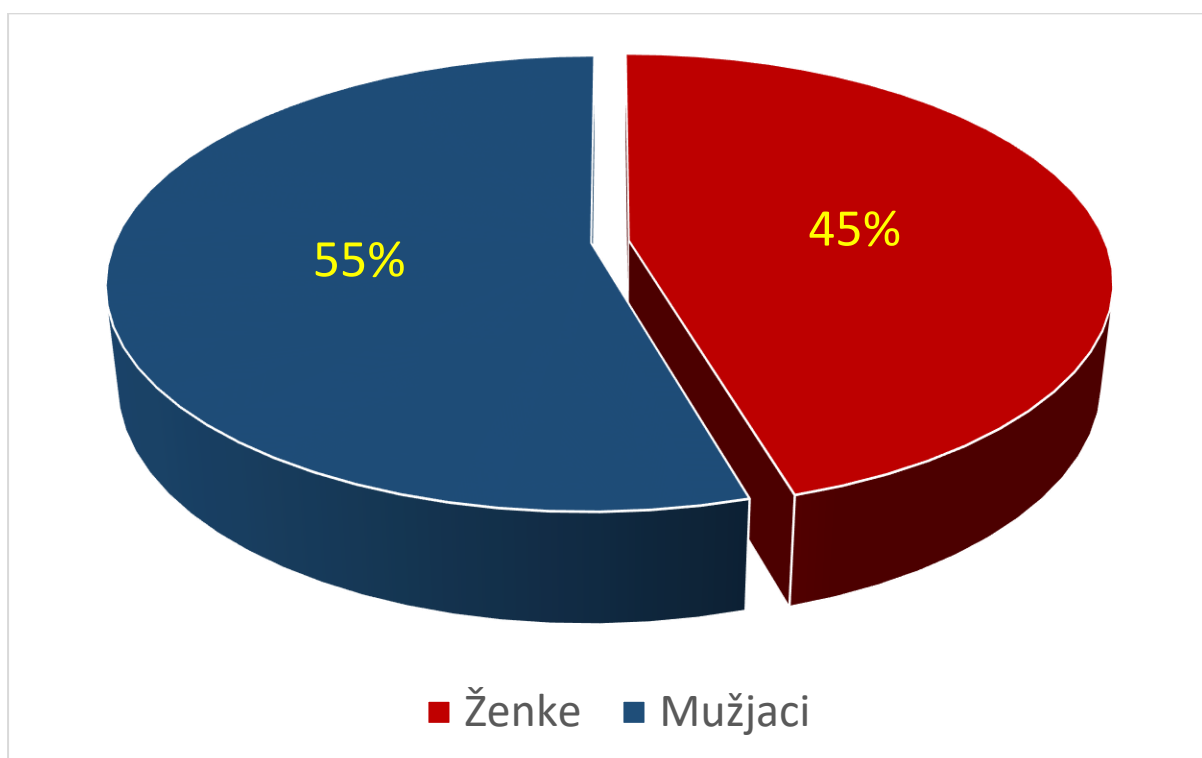
Za provjeru prisutnosti nul-alela korišten je Micro-Checker v.2.2.1 (van Oosterhout i sur., 2004), a deskriptivna statistika genetskih pokazatelja (H_O , H_E) provedena je u programu Arlequin (Excoffier i sur., 2005). Srednji broj alela (A) i efektivni broj alela (A_e) izračunati su pomoću POPGENE v.1.32 (Yeh i sur., 2000), dok je alelno bogatstvo (A_r) i fiksacijski indeks (F_{IS}) izračunat u FSTAT v.2.9.3 (Goudet, 2002).

Procjena efektivne veličine populacije (N_E) provedena je u programu NeEstimator V2 (Do i sur., 2014), a protok gena između populacija određen je putem F_{ST} vrijednosti. Konačno, analiza srodnosti provedena je u programu CERVUS (Kalinowski i sur., 2007) pomoću metode kategoričke distribucije, uz simulacije roditeljstva kada su oba roditelja poznata, kako bi se dobila granična vrijednost vjerojatnosti očinstva (LOD).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati prikupljanja matičnog jata

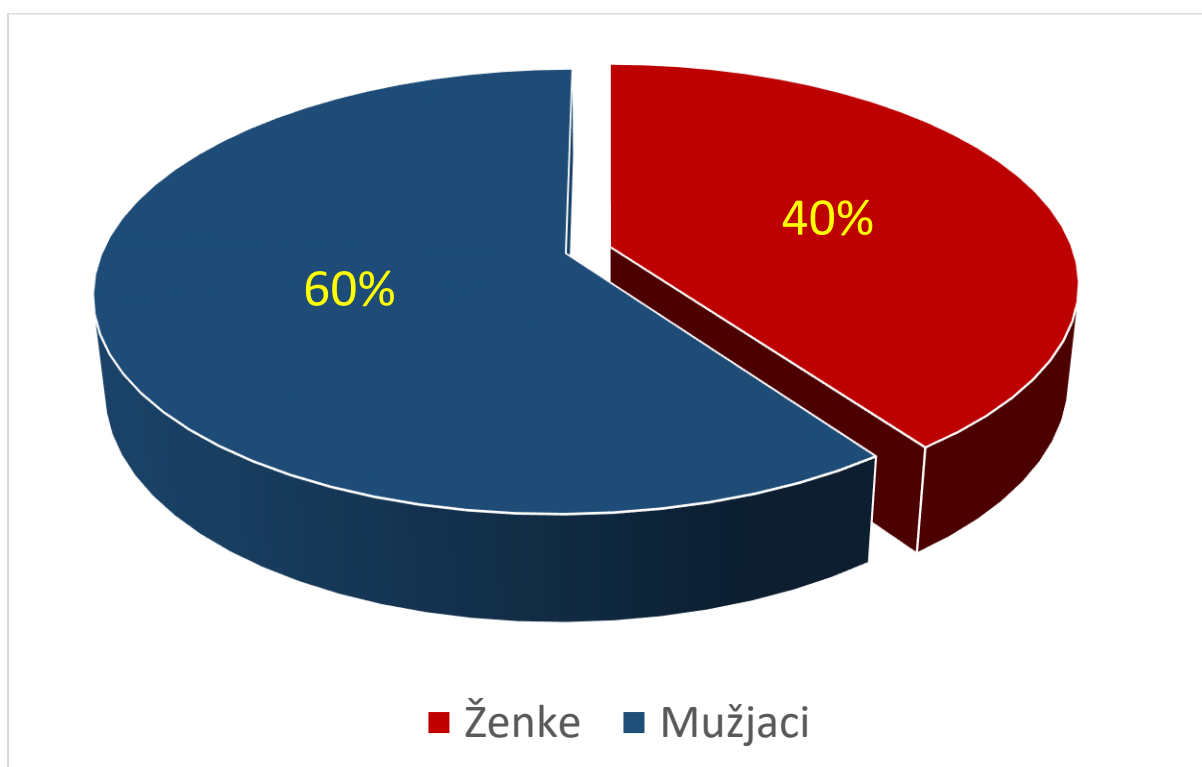
Formiranje matičnog jata hobotnice *Octopus vulgaris* započelo je sustavnim terenskim radom, provedenim u dva zimska perioda. U siječnju 2019. godine ulovljene su 22 žive jedinke, a u veljači 2020. dodatnih 15. Za prikupljanje je korišten prilagođeni ribolovni alat poznat kao „panula“, ali u verziji bez udica i kuka koje se inače rabe pri lovu glavonožaca. Ova modifikacija imala je dvostruku prednost: omogućila je sigurno izvlačenje hobotnica iz mora bez fizičkih ozljeda te je značajno smanjila stres tijekom ulova i transporta. Rezultat je bio izniman — nije zabilježen ni jedan slučaj mortaliteta niti ikakvo mehaničko oštećenje prikupljenih jedinki. Hobotnice ulovljene 2019. godine imale su ukupnu masu od 9,11 kilograma, uz prosječnu tjelesnu masu od $413,95 \pm 176,84$ g. Omjer spolova blago je naginjao u korist mužjaka (12 mužjaka i 10 ženki, slika 17).



Slika 17. Omjer spolova u matičnom jatu hobotnica prikupljenih u 2019. godini.

Analiza mase prema spolu pokazala je da su ženke bile prosječno teže ($472,7 \pm 237,13$ g) od mužjaka ($365 \pm 89,10$ g), što može upućivati na sezonske razlike u tjelesnoj kondiciji, ali i na ulogu ženki u razvoju reproduktivnih tkiva uoči mrijesta. U drugom prikupljanju, provedenom

u veljači 2020., ukupna masa od 15 jedinki iznosila je 8,7 kilograma, s prosječnom masom od $577 \pm 235,58$ g. Ovoga puta omjer spolova bio je u korist mužjaka (9 mužjaka i 6 ženki, slika 18.) no ženke su ponovno bile masivnije ($655 \pm 303,54$ g) od mužjaka ($525 \pm 178,17$ g). Ovakav obrazac, zabilježen u obje godine, u skladu je s opažanjima u prirodnim populacijama gdje ženke hobotnica često postižu veću tjelesnu masu, vjerojatno zbog energetske zahtjeva povezanih s reprodukcijom. Ovi rezultati potvrđuju da je moguće učinkovito prikupljati žive hobotnice u izvrsnom zdravstvenom stanju i tijekom zimskih mjeseci, kada su temperature mora niže i aktivnost mnogih morskih organizama smanjena. Kombinacija jednostavnog, tradicionalnog alata i pažljivo osmišljenih postupaka transporta — uključujući smještaj svake jedinke u zasebnu mrežnu saku i redovitu izmjenu morske vode u transportnim bazenima — pokazala se kao vrlo učinkovita metoda. Takav pristup osigurava ne samo visoku stopu preživljavanja, već i brzu prilagodbu jedinki na uvjete zatočeništva, što je ključan preduvjet za uspješan daljnji uzgoj, istraživanja i potencijalne repopulacijske programe.

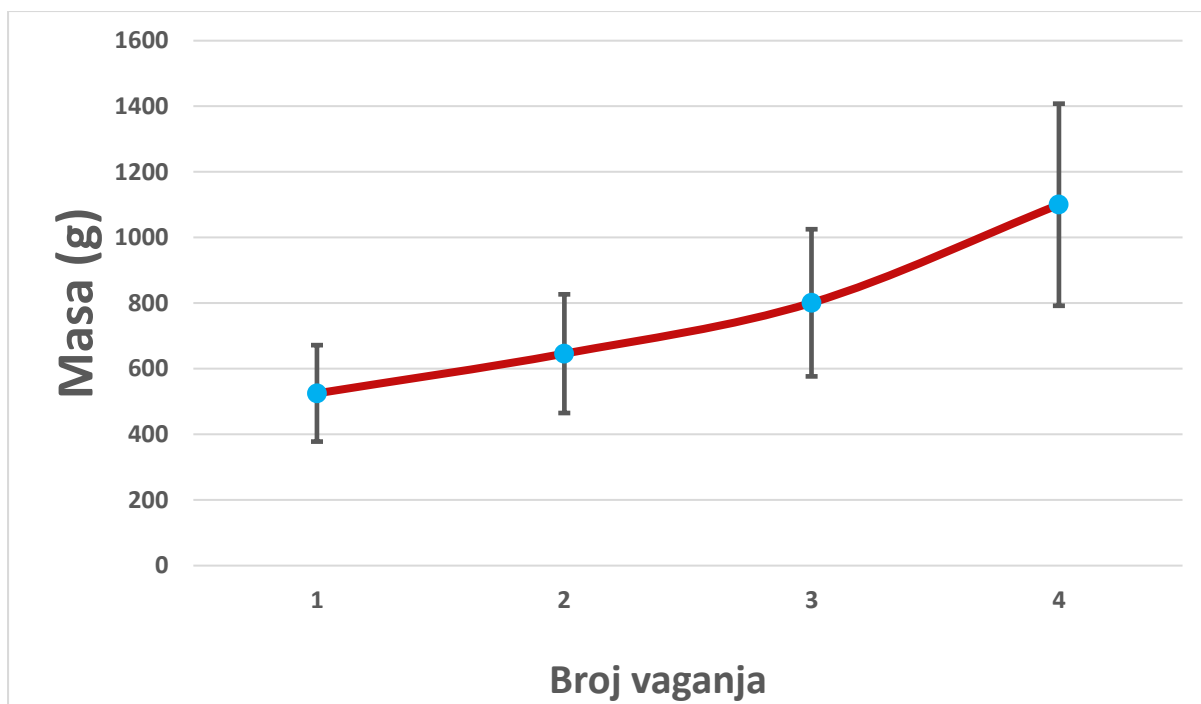


Slika 18. Omjer spolova matica hobotnica prikupljenih u 2020. godini.

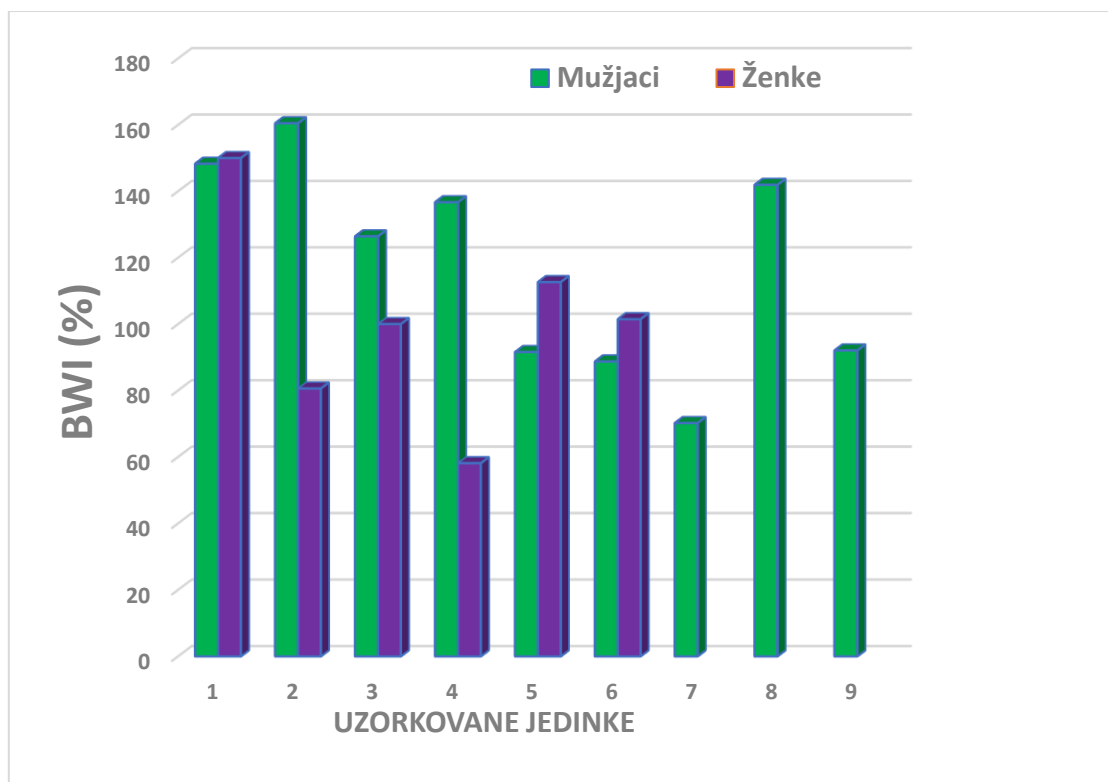
3.2. Rast hobotnice u kontroliranim uvjetima

Praćenje rasta matičnih jedinki hobotnice (*Octopus vulgaris*) u kontroliranim uvjetima predstavlja važan korak u razumijevanju njihovog potencijala za uzgoj, kao i optimizaciju metoda hranjenja u zatočeništvu. Tijekom 2020. godine provedeno je pokusno istraživanje u trajanju od 60 dana, od 17. ožujka do 12. svibnja, s ciljem procjene prilagodbe hobotnica na umjetno okruženje i njihovog odgovora na kontrolirano hranjenje.

Eksperiment je proveden u dva bazena zapremnine 12 m³. Da bi se spriječila neželjena kopulacija, u jednom bazenu nalazilo se 9 mužjaka, a u drugom 6 ženki. Svaka jedinka bila je smještena u zaseban kavez, čime se izbjegao kontakt i mogućnost kanibalizma, poznatog ponašanja kod hobotnica u skućenom prostoru. Hranjenje se provodilo svakodnevno, osim vikendom i na dane kada se vršilo vaganje, kako bi se osigurala kontrola unosa hrane i precizno praćenje rasta. Početna masa jedinki varirala je od najmanjih 310 g do najvećih 1.230 g. Nakon 60 dana uzgoja, ukupna biomasa u oba bazena iznosila je 17,39 kg, a prosječna masa jedinke porasla je na $1.159 \pm 303,92$ g. Najmanja jedinka na kraju pokusa imala je 750 g, dok je najveća dosegla impresivnih 1.945 g. Tijekom cijelog razdoblja nije zabilježen mortalitet, što ukazuje na izuzetno dobru prilagodbu hobotnica na uvjete zatočeništva i na odabrani režim hranjenja (slika 19). Analiza rasta pomoću standardnih zootehničkih parametara pokazala je da je prosječni postotni prirast mase (BWI, slika 20) iznosio $110,62 \pm 31,67$ %, s maksimalnom vrijednošću od 160,49 %, a minimalnom od 58,13 %. Drugim riječima, hobotnice su u prosjeku udvostručile svoju početnu masu tijekom promatranog razdoblja. Prosječna specifična stopa rasta (SGR) iznosila je $1,22 \pm 0,25$ % dnevno, što znači da su hobotnice svakog dana povećavale svoju masu za prosječno 1,22 %. Maksimalna zabilježena vrijednost SGR-a bila je 1,59 %, a najniža 0,76 %.

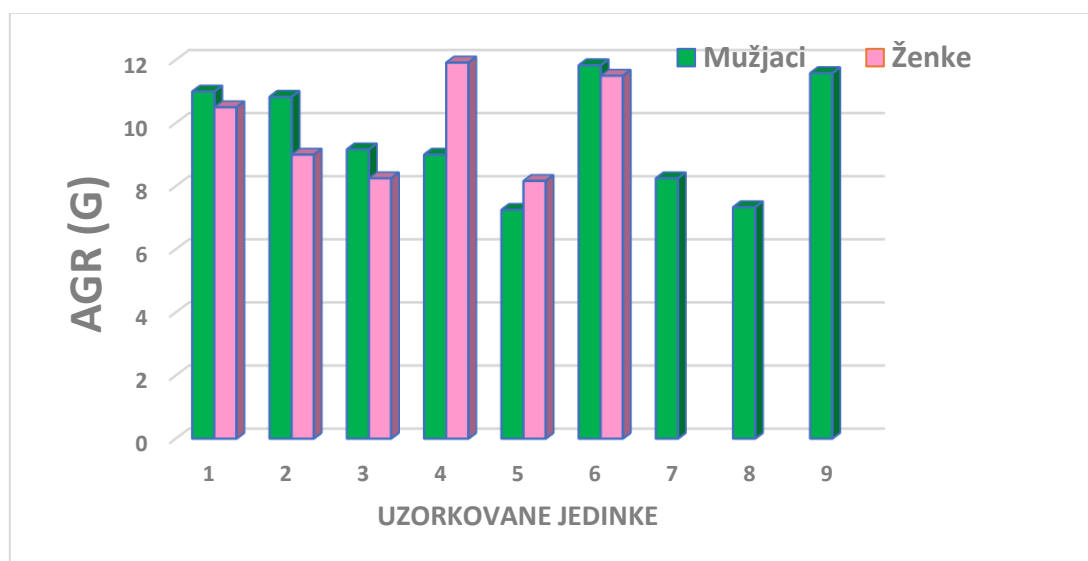


Slika 19. Prosječni prirast mase sa standardnom devijacijom hobotnica tijekom uzgoja od 60 dana.



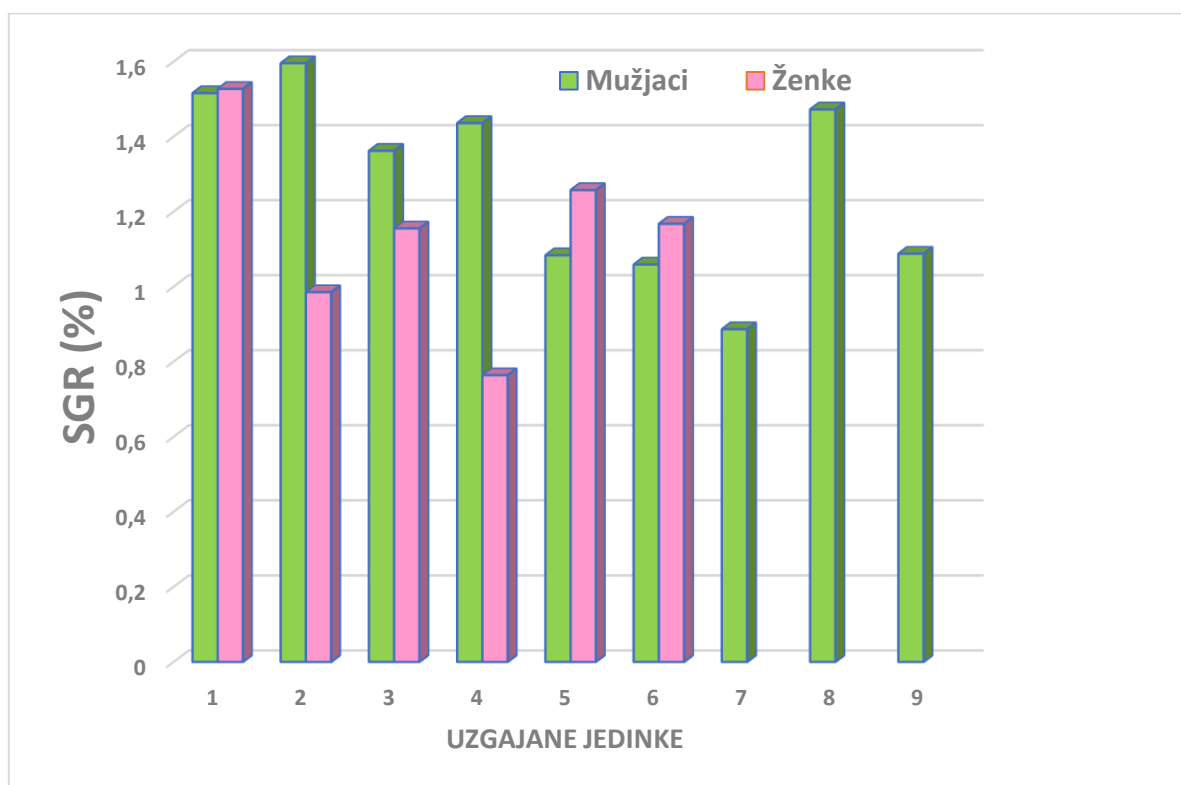
Slika 20. Postotni prosječni prirast mase hobotnica u predmetnom pokusu po spolovima.

Kada se promatra apsolutna stopa rasta (AGR), prosječna vrijednost iznosila je $9,70 \pm 1,68$ g dnevno, uz minimalnih 7,25 g i maksimalnih 11,91 g. Ovi rezultati jasno pokazuju da se, uz adekvatne uvjete i pravilno odabranu prehranu, hobotnica može brzo i učinkovito razvijati u kontroliranom uzgoju (slika 21).



Slika 21. Apsolutna stopa rasta uzgajanih hobotnica po spolovima nakon pokusnog uzgoja.

Odabir hrane jedan je od ključnih čimbenika u postizanju ovakvih rezultata. Iako su rakovi nutritivno vrlo bogati i često se preporučuju kao optimalna hrana za hobotnice, njihova upotreba značajno povećava troškove proizvodnje. Stoga se kao održiva alternativa nameću male pelagičke ribe, čiji nutritivni profil može varirati ovisno o vrsti. Vrste poput srdele (*Sardina pilchardus*) imaju veći udio lipida, dok su vrste poput bukve (*Boops boops*) siromašnije mastima. Prethodna istraživanja pokazala su da prehrana bukvom može rezultirati nešto boljim SGR-om u odnosu na srdelu, dok kombinacija više ribljih vrsta može dodatno povećati rast. Rezultati (slika 22) dobiveni u ovom pokusu ($SGR = 1,22 \pm 0,25 \%$, $AGR = 9,70 \pm 1,68 \text{ g}$) u skladu su s vrijednostima iz literature. Primjerice, García i Valverde (2006) naveli su SGR od $1,11 \pm 0,19 \%$ i AGR od $7,69 \pm 2,38 \text{ g}$ kod hobotnica hranjenih bukvom, dok je Petrić (2013) postigao SGR od $0,94 \pm 0,19 \%$ i AGR od $5,44 \pm 1,63 \text{ g}$ pri prehrani dominantno srdela. To potvrđuje da su uvjeti i prehrana korišteni u ovom istraživanju bili učinkoviti, te da je hobotnica izuzetno prilagodljiv kandidat za akvakulturne sustave i programe repopulacije.



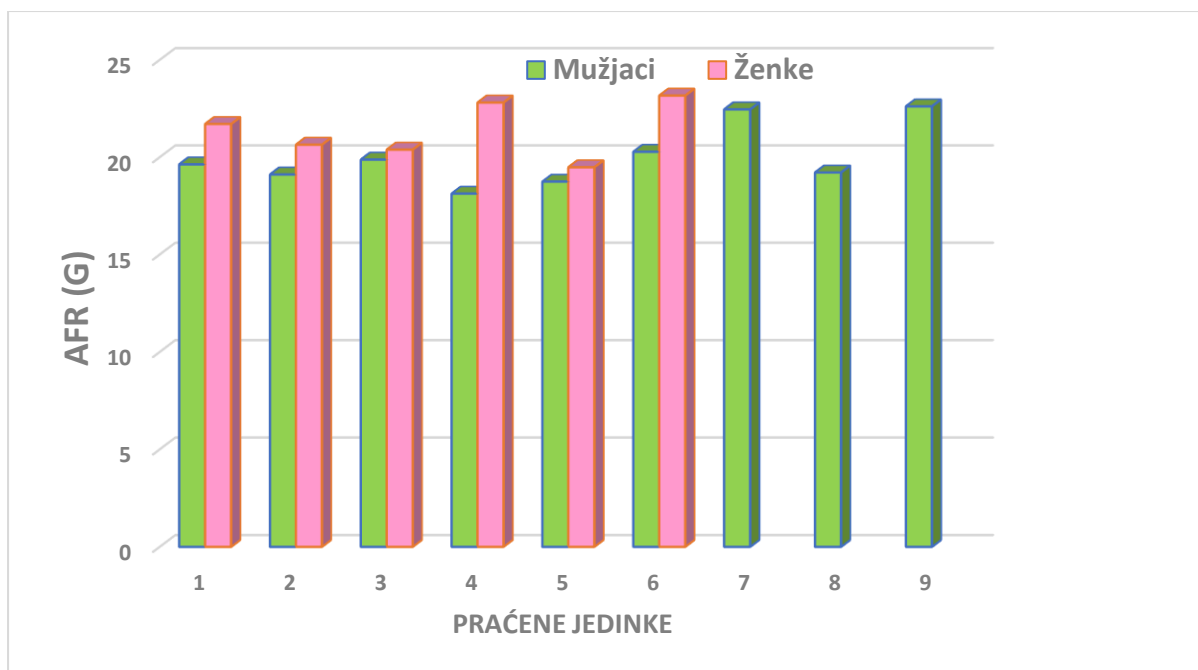
Slika 22. Ukupna specifična stopa rasta (%) hobotnica tijekom pokusa.

Prehrana hobotnice temelji se na različitim skupinama plijena, među kojima rakovi zauzimaju važno mjesto, ali njihova uporaba podrazumijeva visoke troškove te posljedično povećava

cijenu finalnog proizvoda. Kao održivija alternativa sve se češće koriste male pelagičke ribe. One se, prema biokemijskom sastavu tkiva, osobito udjelu lipida, razvrstavaju u „plave“ i „bijele“ vrste. Primjerice, srdela (*Sardina pilchardus*) bogatija je mastima u odnosu na bukvu (*Boops boops*). García i Giménez (2002) pokazali su da hobotnice hranjene bukvom postižu viši specifični rast (SGR $0,78 \pm 0,12\%$) nego one hranjene srdelom (SGR $0,69 \pm 0,08\%$). Još bolji rezultati zabilježeni su kada je u prehrani korištena mješavina vrsta (*S. pilchardus*, *B. boops* i *Trachurus trachurus*), s postignutim SGR-om od 1,91% (Cagnetta, 2000). U istraživanju García i Valverde (2006), hobotnice hranjene bukvom ostvarile su SGR od $1,11 \pm 0,19\%$ te apsolutnu stopu rasta (AGR) od $7,69 \pm 2,38$ g. Sličan obrazac uočen je i u predmetnom pokusu, gdje je prosječni SGR na kraju eksperimenta iznosio $1,22 \pm 0,25\%$, a AGR $9,70 \pm 1,68$ g. Podudarne rezultate donosi i Petrić (2013), u čijem je istraživanju, temeljenom ponajprije na prehrani srdelom, zabilježen SGR od $0,94 \pm 0,19\%$ te AGR od $5,44 \pm 1,63$ g.

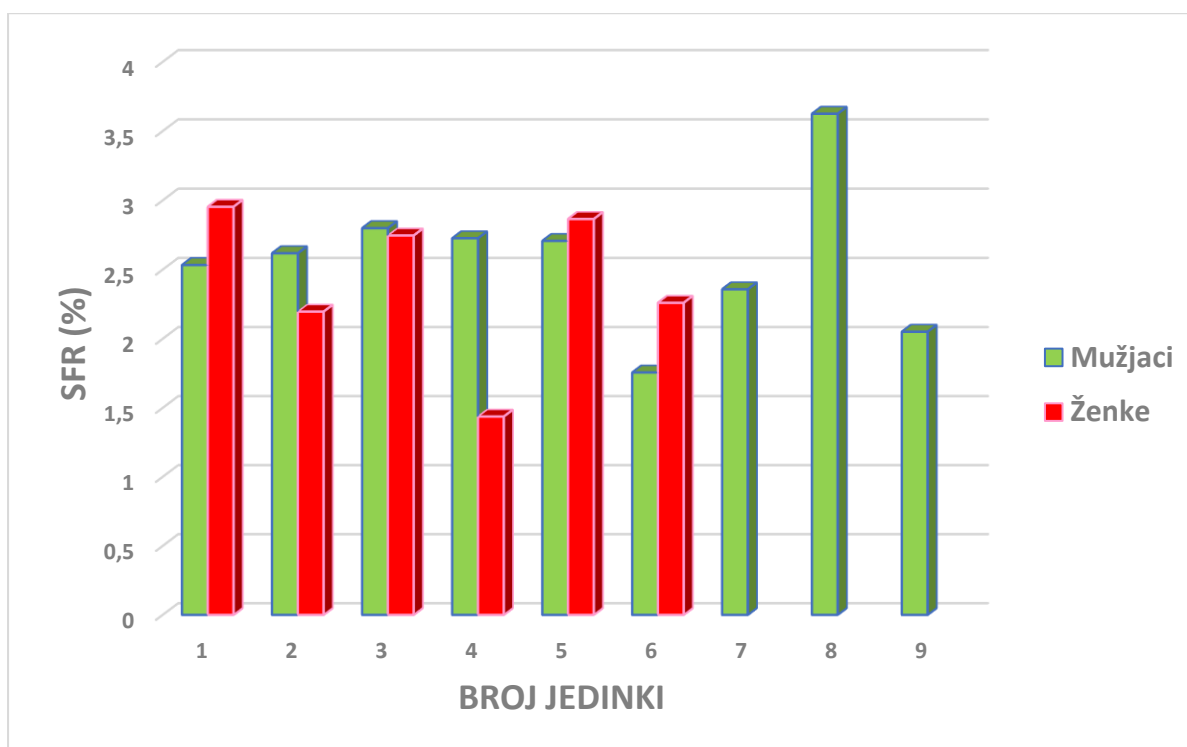
3.3. Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima

Osim stope rasta, još jedan ključan pokazatelj uspješnog uzgoja hobotnica u zatočeništvu je njihova ishrana — koliko hrane konzumiraju, kako tu hranu iskorištavaju i koliko je učinkovita konverzija unesenih nutrijenata u tjelesnu masu. U ovom istraživanju detaljno su praćeni parametri hranjenja tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja, a korištene su dvije vrste male pelagičke ribe: srdela (*Sardina pilchardus*) i incun (*Engraulis encrasicolus*). Rezultati su pokazali da je prosječna apsolutna stopa ishrane (AFR) iznosila $20,54 \pm 1,61$ g dnevno, uz minimalnu vrijednost od 18,12 g i maksimalnu od 23,16 g. Drugim riječima, svaka je hobotnica prosječno konzumirala nešto više od 20 grama ribe dnevno, što je u skladu s njihovim metaboličkim potrebama i veličinom tijela u ovom stadiju uzgoja (slika 23).



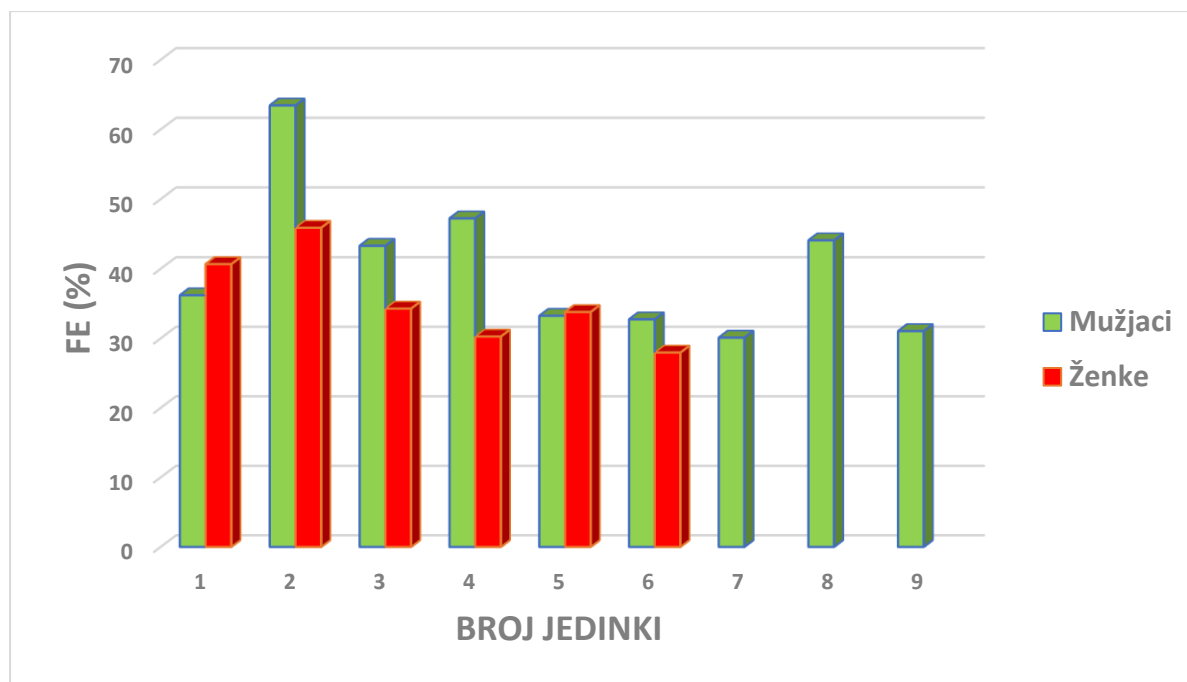
Slika 23. Prosječna apsolutna stopa ishrane hobotnice tijekom pokusa.

Specifična stopa ishrane (SFR) kretala se od 1,44 % do 3,62 %, s prosjekom od $2,51 \pm 0,53$ %, što znači da su hobotnice svakodnevno unosile količinu hrane koja je činila oko 2,5 % njihove tjelesne mase (slika 24).



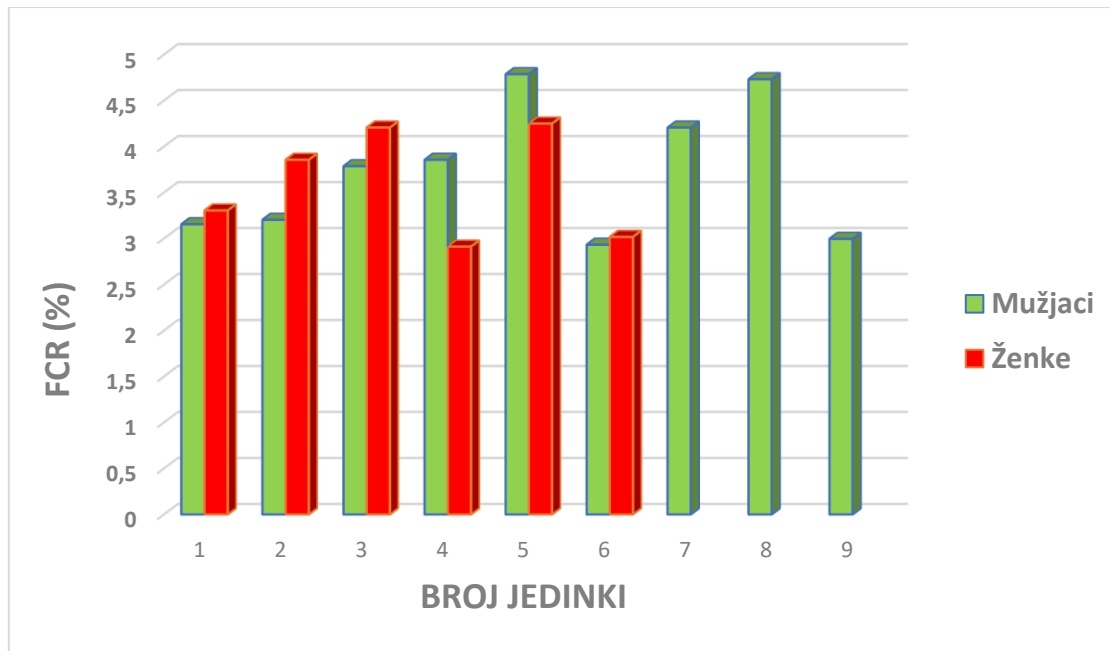
Slika 24. Prosječna dnevna specifična stopa ishrane (SFR) hobotnica tijekom pokusa.

Jedan od najvažnijih pokazatelja učinkovitosti hranjenja je efikasnost hranjenja (FE), koja opisuje koliki se udio unesene hrane pretvara u novu tjelesnu masu. Prosječna vrijednost FE u ovom istraživanju bila je $38,28 \pm 9,34$ %, s minimalnom vrijednošću od 27,96 % i maksimalnom od 63,44 %. To znači da su hobotnice iskorištavale u prosjeku nešto više od jedne trećine unesene hrane za rast, dok se ostatak trošio na osnovne metaboličke funkcije, pokretanje i druge životne procese (slika 25).



Slika 25. Ukupna efikasnost hranjenja hobotnica tijekom pokusa.

Indeks konverzije hrane (FCR), koji predstavlja omjer između količine unesene hrane i prirasta mase, iznosio je prosječno $3,70 \pm 0,65$, uz minimalnih 2,92 i maksimalnih 4,79. Niže vrijednosti FCR-a općenito ukazuju na veću učinkovitost proizvodnje (slika 26), pa se rezultati ovog istraživanja mogu smatrati povoljnima, osobito u usporedbi s nekim ranijim istraživanjima u kojima su vrijednosti FCR-a bile višestruko veće.



Slika 26. Prosječni indeks konverzije hrane hobotnica tijekom pokusa.

Kada se rezultati dobiveni ovim pokusom usporede s literaturnim podacima, vidljivo je da prehrana korištena u ovom istraživanju (*S. pilchardus* i *E. encrasicolus*) daje slične ili bolje rezultate od prehrane bazirane na bukvi (*Boops boops*) ili drugim vrstama riba. Primjerice, García i Giménez (2002) utvrdili su da bukva potiče nešto bolji specifični rast od srdele, ali su srdele u nekim slučajevima rezultirale većom specifičnom stopom ishrane. Petrić (2013) je u pokusu s dominantnim udjelom srdele (73 % u prehrani) zabilježio znatno veće vrijednosti AFR-a (62,55 g), ali i višestruko slabiju efikasnost hranjenja (FE = 8,64 %) i veći FCR (11,94), što ukazuje da visoka konzumacija hrane ne mora nužno značiti i bolji rast. Usporedbe s radom García i Valverde (2006), u kojem je prehrana bazirana na bukvi rezultirala AFR-om od $18,88 \pm 5,79$ g, SFR-om od $2,63 \pm 0,40$ %, FE-om od $40,76 \pm 2,57$ % i FCR-om od $2,46 \pm 0,16$, pokazuju da su rezultati ovog istraživanja vrlo slični. To sugerira da su nutritivne potrebe hobotnica u zatočeništvu zadovoljene korištenjem male pelagičke ribe, a da izbor vrste može imati utjecaj na pojedine parametre, ali ne nužno i na ukupni uspjeh uzgoja. Važno je naglasiti da na učinkovitost hranjenja ne utječe samo vrsta plijena, već i brojni drugi čimbenici poput temperature mora, učestalosti hranjenja, individualne kondicije i sposobnosti prilagodbe hobotnica na život u zatočeništvu. U ovom istraživanju kombinacija optimalne prehrane, stabilnih okolišnih uvjeta i minimalnog stresa omogućila je postizanje solidne ravnoteže između rasta i učinkovitosti konverzije hrane, čime je potvrđen potencijal *O. vulgaris* kao vrste prikladne za akvakulturu i repulacijske programe.

3.4. Plodnost

Reproduktivna sposobnost matičnog jata ključan je element pri procjeni potencijala hobotnica za komercijalni uzgoj i programe repopulacije. Fekunditet, odnosno broj jaja koje ženka može proizvesti, izravno utječe na mogućnost proizvodnje velikog broja mladi, a time i na dugoročnu održivost populacije u kontroliranim uvjetima. Tijekom istraživanja provedenog 2019. godine, od ukupno 10 ženki u matičnom jatu, tri su imale uspješnu oplodnju. Svaka ženka bila je smještena u zaseban bazen, čime se osigurala individualna kontrola uvjeta, minimizirao stres te spriječila mogućnost međusobne agresije ili kanibalizma. Prosječna masa ženki u trenutku oplodnje iznosila je $981,67 \pm 84,61$ g, dok je prosječna masa mokrih jaja bila $379,67 \pm 27,54$ g. Raspon ukupnog broja jaja po ženkama kretao se od 290.000 do 320.000, što je iznimno visok reproduktivni kapacitet i u skladu s poznatim biološkim karakteristikama ove vrste.

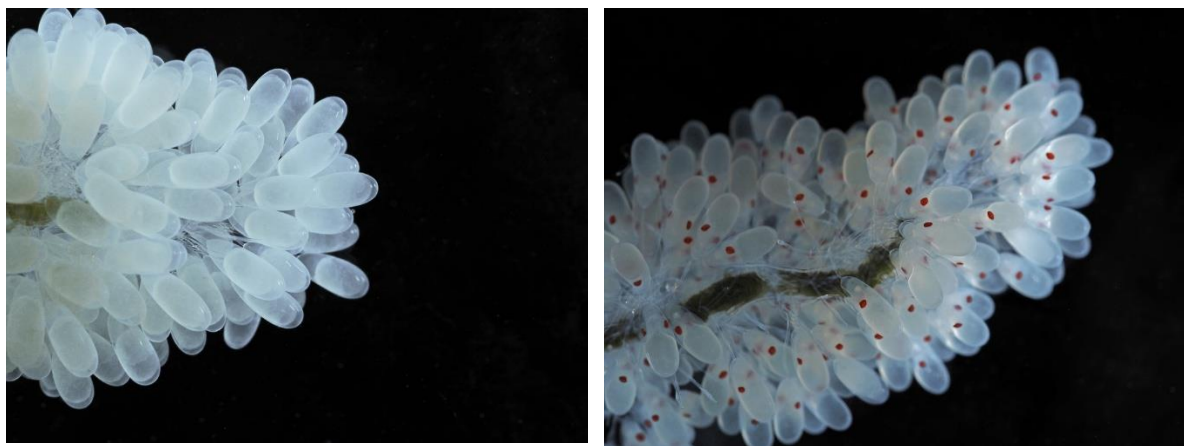
Morfološka analiza jaja pokazala je prosječnu duljinu od $3,29 \pm 0,04$ mm, dok su paraličinke 10 dana nakon izvaljivanja imale prosječnu duljinu plašta od $2,48 \pm 0,13$ mm (tablica 3). Ovi podaci važni su jer duljina jaja i novoisvaljenih paraličinki može biti indikator kvalitete potomstva i razvoja embrija.

Tablica 3. Plodnos, broj izlegnutih jaja i morfometrija paraličinki uzgajanih hobotnica.

Mužjak	Ženka	Masa ženke (g)	Masa mokrih jaja (g)	Ukupni broj izlegnutih jaja	Duljina jaja (mm)	Masa pojedinačnog jaja (g)	Duljina plašta paraličinki (mm)
19M07	19F03	910	353	290 868	$3,24 \pm 0,25$	$1,21 \pm 0,06$	$2,51 \pm 0,13$
19M11	19F01	960	378	296 327	$3,26 \pm 0,24$	$1,26 \pm 0,09$	$2,43 \pm 0,15$
19M10	19F06	1075	408	320 571	$3,27 \pm 0,21$	$1,27 \pm 0,18$	$2,51 \pm 0,11$
Prosjek		$981,67 \pm 84,60$	$379,67 \pm 27,54$	$302 612 \pm 15,80$	$3,29 \pm 0,04$	$1,25 \pm 0,03$	$2,48 \pm 0,13$

Na primjer, veća jaja često ukazuju na bolju energetska zalihu, što može povećati šanse za preživljavanje u ranim stadijima života. Dobiveni rezultati uspoređeni su s prethodnim istraživanjima. Iglesias i sur. (2000) naveli su prosječan broj od 328.500 ± 214.228 jaja po ženki, s duljinom jaja od $2,51 \pm 0,05$ mm na početku embrionalnog razvoja i duljinom plašta paraličinki od $2,95 \pm 0,19$ mm. Kivengea i sur. (2014) zabilježili su nešto niže prosječne

vrijednosti fekunditeta (154.057 ± 29.131 jaja) i duljine jaja ($2,8 \pm 0,4$ mm). Usporedba pokazuje da su rezultati ovog istraživanja unutar očekivanih granica, a duljina jaja čak nešto viša od nekih ranije zabilježenih vrijednosti, što može upućivati na povoljne uvjete držanja i hranjenja matičnog jata. Osim samih brojčanih podataka, bitno je istaknuti i kvalitativni aspekt reprodukcije u zatočeništvu. Kod mnogih morskih organizama, uključujući glavonošce, proces mrijesta može biti osjetljiv na promjene okolišnih uvjeta, poput temperature, svjetlosnog režima i dostupnosti kvalitetne hrane. U ovom istraživanju, iako je udio ženki s uspješnom reprodukcijom iznosio samo 30 %, što je manje od stopa reproduktivnog uspjeha >90 % zabilježenih u nekim drugim radovima, broj i veličina proizvedenih jaja pokazuju da je hobotnica sposobna ostvariti visoku reproduktivnu produktivnost i u kontroliranim uvjetima, kada su osnovni okolišni i prehrambeni uvjeti optimalni. Ovi rezultati naglašavaju da je, uz tehničko savladavanje uzgoja, potrebno dodatno istražiti čimbenike koji potiču ili ograničavaju mrijest u zatočeništvu — uključujući socijalne interakcije, dinamiku spolnog sazrijevanja i precizno prilagođene okolišne uvjete. Bolje razumijevanje ovih parametara moglo bi u budućnosti značajno povećati uspješnost reprodukcije i time dodatno ojačati potencijal hobotnice kao vrste pogodnog kandidata za komercijalni uzgoj i repopulacijske programe. Slika 27. ilustrira oplođena jaja hobotnice u ranoj razvojnoj fazi i na početku embriogeneze.



Slika 27. Oplođena jaja hobotnice u ranoj razvojnoj fazi i u ranoj embriogenezi (izvor: Pero Ugarković).

3.5. Genetska raznolikost hobotnice i analiza srodnosti

Očuvanje genetske raznolikosti temeljni je preduvjet za dugoročnu održivost svake vrste, bilo u prirodnim populacijama ili u populacijama uzgojenim u zatočeništvu. Kod vrsta koje se planira uzgajati i potencijalno repopulirati, poput hobotnica, praćenje genetske strukture matičnog jata ključno je kako bi se spriječila genetska erozija, smanjila inbreeding depresija i održala visoka reproduktivna sposobnost. U ovom istraživanju provedena je višelokusna genotipizacija svih prikupljenih jedinki iz matičnih jata 2019. (19F0_M, 19F0_Z) i 2020. godine (20F0_M, 20F0_Z), potomaka iz jata 2019. (paraličinki 19F1_P) te potencijalnih potomaka istog jata ponovno ulovljenih u moru (19F1_O). Analiza je provedena korištenjem šest mikrosatelitnih lokusa specifičnih za ovu vrstu, što je omogućilo visoku rezoluciju u detekciji genetskih razlika i srodničkih veza. Rezultati pokazuju da je srednja očekivana heterozigotnost (He) bila relativno visoka za sve populacije, iznad 0,66, što ukazuje na dobru razinu genetske raznolikosti. Najviša vrijednost He zabilježena je kod mužjaka iz matičnog jata 2019. (0,83), dok je najniža bila kod paričinki iz istog jata (0,66). Srednja uočena heterozigotnost (Ho) kretala se od 0,53 do 0,82 (tablica 4), pri čemu je najniža vrijednost također zabilježena kod mužjaka iz 2019., a najviše kod mužjaka iz 2020. i ulovljenih potomaka (19F1_O).

Tablica 8. Genetska raznolikosti vrste *Octopus vulgaris* koja uključuje broj uzoraka (N), srednji broj alela (A), efektivni broj alela (Ae), bogatstvo alela (Ar), privatne alele (Apr), očekivanu (He) i uočenu (Ho) heterozigotnost, fiksacijski indeks (FIS) za 6 mikrosatelitnih lokusa.

Populacije	N	Alelna raznolikost				Heterozigotnost		Fis	N _E
		A	Ae	Ar	Apr	Ho	He		
19F0_M	10	9,5±4,9	7,3±3,7	6,2±2,5	3	0,83±0,3	0,53±0,2	0,011	∞ (104, ∞)
19F0_Z	10	8,8±4,2	6,5±3,5	6,0±2,3	3	0,69±0,21	0,81±0,2	0,143	∞ (21, ∞)
20F0_M	14	9,5±4,5	6,5±3,0	5,7±2,0	7	0,74±0,3	0,82±0,1	0,105	∞ (40, ∞)
20F0_Z	6	6,2±3,1	5,2±2,7	5,7±2,5	3	0,74±0,3	0,82±0,2	0,110	∞ (8, ∞)
19F1_P	30	8,5±3,5	4,6±2,3	4,6±2,5	5	0,66±0,3	0,69±0,3	0,042	14 (10, 21)
19F1_O	23	13,2±6,5	8,9±5,1	6,2±2,2	13	0,76±0,2	0,82±0,2	0,075	205 (65, ∞)
Ukupno		9,3±1,2	6,5±3,4	5,9±2,2		0,76±0,2	0,79±0,2	0,081	

Cjeloviti prikaz FST vrijednosti između parova populacija hobotica iz seta podataka prikazan je u Tablici 9.

Tablica 9. FST vrijednosti između parova populacija hobotnice. Značajne FST vrijednosti su podcrtane.

	19F0_M	19F0_Z	20F0_M	20F0_Z	19F1_P
19F0_Z	0,00386				
20F0_M	0,01119	0,01057			
20F0_Z	0,00977	0,00722	0,00236		
19F1_P	<u>0,06006</u>	<u>0,03596</u>	<u>0,10244</u>	<u>0,08652</u>	
19F1_O	0,01347	0,00473	0,02232	0,01033	<u>0,05076</u>

Alelna bogatstvo (A_r), koje predstavlja broj alela korigiran na veličinu uzorka, variralo je između 4,6 (paraličinke 19F1_P) i 6,2 (mužjaci iz 2019. i potomci 19F1_O). Broj privatnih alela (A_{pr}), odnosno alela prisutnih isključivo u jednoj populaciji, kretao se od minimalna 3 do maksimalnih 13, što upućuje na to da određene grupe još uvijek nose jedinstvene genetske informacije koje bi trebalo očuvati u budućem uzgoju.

Fiksacijski indeks (FIS), pokazatelj stupnja križanja u bliskom srodstvu, bio je nizak do umjeren (0,01–0,110), što sugerira da do sada nije došlo do značajne genetske degradacije zbog parenja bliskih srodnika. Posebno vrijedi istaknuti da je efektivna veličina populacije (NE) bila najveća za potomke 19F1_O (205), što ukazuje na potencijalno dobru reproduktivnu bazu unatoč relativno malom uzorku jedinki. Analiza genetske diferencijacije između populacija provedena je pomoću FST vrijednosti. Statistički značajne razlike uočene su u 5 od 15 usporedbi, što potvrđuje da među skupinama postoji određena genetska struktura. Ova diferencijacija može biti posljedica različitog podrijetla jedinki, prirodne populacijske dinamike ili ograničenog miješanja između skupina. Simulacijom analize srodnosti u programu CERVUS dobivene su vrijednost LOD za set podataka. U Tablici 10. navedene su granične vrijednosti za potencijalne majke, očeve i par roditelja s postotkom pouzdanosti 80 i 95 %.

Tablica 10. Granične vrijednosti LOD.

	LOD 95%	LOD 80%
Samo majka	-9,00	-999,0
Samo otac	-5,00	-999,00
Par roditelja	-1,44	-999,00

Dodatno, simulacijom analize srodnosti u programu CERVUS provedena je identifikacija roditeljskih parova. Kod 30 analiziranih paraličinki (19F1_P) identificirano je devet jedinki s jasno definiranim roditeljskim parom (ženka 19F06 i mužjak 19M10) uz visoku razinu pouzdanosti. Kod ulovljenih potomaka (19F1_O) prepoznata su dva para roditelja, što potvrđuje mogućnost povezivanja divljih ulova s uzgojenim matičnim jedinkama. Ovi rezultati imaju važnu praktičnu implikaciju: pokazuju da, iako je broj uzgojenih jedinki relativno mali, genetska raznolikost je još uvijek na zadovoljavajućoj razini, a identifikacija roditeljskih veza otvara mogućnost preciznog praćenja i dokumentiranja doprinosa pojedinih jedinki repulacijskim naporima. Za budući rad, preporučuje se održavanje visokog broja jedinki u matičnom jatu, rotacija reproduktivnih parova i povremeno uključivanje novih jedinki iz prirode kako bi se očuvala široka genetska baza.

4.ZAKLJUČCI

Na temelju zootehničkih parametra i korištenja mikrosatelitnih biljega u istraživanju provedenom 2019. godine i 2020. godine doneseni su sljedeći zaključci.

1. Prikupljanje živih hobotnica, matičnih jedinki pokazao se kao najmanji problem u istraživanju. Tradicionalni alat panula jednostavne konstrukcije koji se sastojao od motovila na kojem se nalazila monofilamentna struna, polučio je odličnim rezultatima u ulovima živih jedinki namijenjenim daljnjem uzgoju. Imobiliziranje za vrijeme transporta u zasebnim mrežnim sakama i redovita izmjena mora u transportnom bazenu, pokazali su se kao odlična metoda za transport živih jedinki.

2. Pod uvjetom da se ulov i transport obave uz minimalni stres, daljnje preživljavanje hobotnica je na visokoj razini. Mortalitet za vrijeme ulova i transporta nije zabilježen, dok je period prilagodbe na uvjete zatočeništva jako kratak, svega nekoliko sati. Međutim jedinke moraju biti fizički odvojene što predstavlja zootehnički izazov.

3. Rezultati šezdesetodnevnog uzgojnog pokusa predstavljaju hobotnicu kao pogodnog kandidata za uzgoj ili za potrebe repopulacije. Održavanje matičnog jata se provelo u zatvorenom tipu bazena koji je spriječio gubitke zbog kanibalizma. Prehrana se bazirala isključivo na sitnoj pelagičkoj ribi, a rezultati su opisani uzgojnim parametrima. Prirast mase (BWI) $110,62 \pm 31,67\%$, specifična stopa rasta (SGR) $1,22 \pm 0,25\%$ i apsolutna stopa rasta (AGR) $9,70 \pm 1,68$ grama.

4. Uz parametre rasta hobotnice, u svrhu procijene utjecaja hranjenja, odabrani su različiti parametri iskoristivosti hrane: Apsolutna stopa hranjenja (AFR) $20,54 \pm 1,61$ grama, specifična stopa ishrane (SFR) $2,51 \pm 0,53\%$, efikasnost hranjenja (FE) $38,28 \pm 9,34\%$ i indeks konverzije hrane (FCR) $3,70 \pm 0,65\%$. Pokusom dobivene vrijednosti potvrđuju da je moguća uspostava matičnih jedinki u uvjetima zatočeništva i njihovo kondicioniranje prije reprodukcije.

5. Jedna od najvažnijih poželjnih karakteristika hobotnica u zatočeništvu je reprodukcija. U brojnim istraživanjima potvrđeno je da hobotnice u zatočeništvu mogu imati uspješnost repodukcije veću od 90%. Međutim, u istraživanju 2019. godine tek su 3 ženke imale uspješnu reprodukciju, što nam donosi 30% uspješnosti.

6. U predmetnom istraživanju raspon ukupnog broja dobivenih jaja kretao se od 290 000 do 320 000 po ženki. Prosječna duljina jaja iznosila je $3,29 \pm 0,04$ mm , a prosječna masa jaja 1,24

$\pm 0,03$ grama. Prvih 30 dana, paraličinke su hranjene ranim razvojnim stadijima (zoa) raka žbirca *E. verrucosa*. Kanibalizam nije zabilježen sve dok nije zabilježena značajna pokretljivost paraličinki.

7. Analiza genetske raznolikosti kod 30 paraličinki (populacija 19F1_P) rezultirala je sa 9 prepoznatih paraličinki za roditeljski par (19F06 i 19M10) sa visokom razinom pouzdanosti, a primjena 6 neutralnih mikrosatelitnih biljega omogućila je identifikaciju dva sigurna potomka matičnog jata hobotnice 19F1_O_09 i 19F1_O_12. Stoga, ovi rezultati upućuju na mogućnost repopulacije hobotnicama dobivenih iz kontroliranih uvjeta, ako uzmemo u obzir da su samo 23 jedinke obuhvaćale jato uzorkovanih jedinki na kojima je odrađena analiza srodnosti.

8. Detaljna istraživanja životnog ciklusa i ekologije vrste, područja mrijesta i rasta hobotnica i genetske raznolikosti populacija pružaju dodatne informacije nužne za odvijanje procesa upravljanja resursima, mogućnosti uspješne repopulacije kao i povećanja reproduktivne uspješnosti. Problemima kao što su socijalna, ekonomska i biološka raznolikost, također je potrebno dati jednaku važnost u procjeni potencijalne uloge obnavljanja ili povećavanje matičnog jata programima u prirodnoj sredini.

5. LITERATURA

Araki, H. & Schmid, C. (2010). Is hatchery stocking a help or a harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture*, 308, S2–S2.

Araki, H., Berejikian, B.A., Ford, M.J. & Blouin, M.S. (2008). Fitness of hatchery-reared salmonids in the wild. *Evolutionary Applications*, 1(2), 342–355.

Bell, J.D., Rothlisberg, P.C., Munro, J.L., Loneragan, N.R., Nash, W.J., Ward, R.D. & Andrew, N.L. (2005). Restocking and stock enhancement of marine invertebrate fisheries. *Advances in Marine Biology*, 49, 1–370.

Birch, J., Schnell, A. & Clayton, N. (2021). Dimensions of animal consciousness. *Trends in Cognitive Sciences*, 25(10), 783–795.

Blankenship, H.L. & Leber, K.M. (1995). A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium*, 15, 167–175.

Boal, J.G. (2006). Social recognition: a top-down view of cephalopod behavior. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 39(2), 75–84.

Boletzky, S.V. (1987). Embryonic phase. In: P.R. Boyle (ed.), *Cephalopod Life Cycles*, Vol. II: Comparative Reviews (pp. 23–25). London: Academic Press.

Boucaud-Camou, E. & Boucher-Rodoni, R. (1983). Feeding and digestion in cephalopods. In: A.S.M. Wilbur (ed.), *The Mollusca, Physiology, Part 2 (Vol. 5)*. London: Academic Press.

Boyle, P.R. & Rodhouse, P.G. (2005). *Cephalopods: Ecology and Fisheries*. Oxford: Blackwell Science.

Boyle, P. & Rodhouse, P. (2006). *Cephalopods: Ecology and Fisheries (2nd ed.)*. Oxford: Blackwell Publishing.

Budelmann, B.U. (1995). The cephalopod nervous system: what evolution has made of the molluscan design. *Brain, Behavior and Evolution*, 46(1), 67–78.

Budelmann, B.U. (1996). Active marine predators: The sensory world of cephalopods. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 27(2–3), 59–75.

Byrne, R.A., Kuba, M. & Griebel, U. (2006). *Octopus vulgaris*: A model for comparative analysis of cognition. In: A. Menzel & E. Wasserman (eds), *Comparative Cognition* (pp. 69–88). Oxford: Oxford University Press.

Cagnetta, P. & Sublimi, A. (2000). Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris*) when fed on monodiet. In: *Recent Advances in Mediterranean Aquaculture – Finfish Species Diversification (Cahiers Options Méditerranéennes*, 47, pp. 331–336). Zaragoza: CIHEAM-IAMZ.

Casalini, A., Roncarati, A. & Emmanuele, P. (2020). Evaluation of reproductive performances of the common octopus (*Octopus vulgaris*) reared in water recirculation systems and fed different diets. *Scientific Reports*, 10, 15261.

- Cinoti, N. (2007). Mrijest i uzgoj najranijih stadija hobotnice (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797.) u kontroliranim uvjetima (diplomski rad). Split: Sveučilište u Splitu, Studijski centar za studije mora.
- Devin, M. & Bell, J.D. (2008). Restocking, stock enhancement, and sea ranching: Arenas of progress. *Reviews in Fisheries Science*, 16(1–3), 357–365.
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J. & Ovenden, J.R. (2014). NeEstimator V2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14, 209–214.
- FAO (1997). Review of the State of World Aquaculture. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action. Rome: FAO.
- FAO/GFCM (2023). Working Group on Stock Assessment of Small Pelagic Species – Report. Rome: FAO.
- Finn, J., Tregenza, T. & Norman, M. (2009). Defensive tool use in a coconut-carrying octopus. *Current Biology*, 19(23), R1069–R1070.
- Fiorito, G., von Planta, C. & Scotto, P. (1990). Problem solving ability of *Octopus vulgaris* Lamarck (*Mollusca, Cephalopoda*). *Behavioural and Neural Biology*, 53(2), 217–230.
- Franetović, I. (2002). Čeljusti jadranskih glavonožaca (*Cephalopoda*) u određivanju njihove vrste i veličine (diplomski rad). Zagreb: Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- García, B. & Valverde, J. (2006). Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on growing. *Aquaculture*, 253, 502–511.
- García, B. & Aguado-Giménez, F. (2002). Influence of diet on growth and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 211, 171–182.
- Godfrey-Smith, P. (2016). *Other Minds: The Octopus and the Evolution of Intelligent Life*. New York: Farrar, Straus and Giroux.
- Goudet, J. (2002). FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (v2.9.3.2). Available at: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Hamasaki, K. & Kitada, S. (2006). A review of kuruma prawn *Penaeus japonicus* stock enhancement in Japan. *Fisheries Research*, 80, 8–90.
- Hanlon, R.T. & Messenger, J.B. (1996). *Cephalopod Behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Huffard, C.L. (2005). *The behavioral ecology and locomotion of Abdopus aculeatus (d'Orbigny, 1834)*. Berkeley: University of California Press.

- Iglesias, J., Sánchez, F.J., Otero, J.J. & Moxica, C. (2000). Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47, 313–321.
- Iglesias, J., Otero, J.J., Moxica, C., Fuentes, L. & Sánchez, F.J. (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*) under culture conditions: Paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12(4–5), 481–487.
- Iglesias, J., Fuentes, L. & Villanueva, R. (2014). *Cephalopod Culture*. Dordrecht: Springer, 507 pp.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.
- Kier, W.M. & Smith, A.M. (1985). Tongues, tentacles and trunks: the biomechanics of movement in muscular-hydrostats. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 83(4), 307–324.
- Kivengea, G.M., Ntiba, M.J., Sigana, D.O. & Muthumbi, A.W. (2014). Reproductive biology of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) in South Kenya. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 13(1), 47–56.
- Kitada, S. (2018). Economic, ecological and genetic impacts of marine stock enhancement and sea ranching: A systematic review. *Fish and Fisheries*, 19(3), 511–532.
- Kitada, S. (2020). Lessons from Japan marine stock enhancement and sea ranching programmes over 100 years. *Reviews in Aquaculture*, 12, 1944–1969.
- Kröger, B., Vinther, J. & Fuchs, D. (2011). Cephalopod origin and evolution: A congruent picture from fossils, development and molecules. *BioEssays*, 33, 602–613.
- Kuba, M.J., Byrne, R.A., Meisel, D.V. & Mather, J.A. (2006). Observational learning in *Octopus vulgaris*. *Science*, 313(5795), 1533.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. & Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, 19(15), 4293–4293.
- Lorenzen, K., Beveridge, M.C.M. & Mangel, M. (2010). On the merit of the ‘stock enhancement’ concept: quantifying benefits, risks, and uncertainties using models. *Reviews in Fisheries Science*, 18(2), 189–200.
- Mangold, K. (1983). *Octopus vulgaris*. In: P.R. Boyle (ed.), *Cephalopod Life Cycles*, Vol. I: Species Accounts (pp. 335–364). London: Academic Press.
- Matoničkin, I., Habdija, I. & Primc-Habdija, B. (1998). *Beskranježnjaci – biologija nižih avvertebrata*. Zagreb: Školska knjiga.
- Mather, J.A. & Anderson, R.C. (1999). Exploration, play, and habituation in octopuses (*Octopus dofleini*). *Journal of Comparative Psychology*, 113(3), 333–338.

- Mather, J.A. & O'Dor, R.K. (1991). Foraging strategies and predation risk shape the natural history of juvenile *Octopus vulgaris*. *Bulletin of Marine Science*, 49, 256–269.
- Naud, M.J., Havenhand, J.N., McKinnon, J.F. & Shaw, P.W. (2005). Evidence for biased use of sperm sources in the multiple-mating squid *Sepioteuthis australis*. *Evolution*, 59(4), 767–779.
- Nixon, M. & Young, J.Z. (2003). *The Brains and Lives of Cephalopods*. Oxford: Oxford University Press.
- Norman, M.D. (2000). *Cephalopods: A World Guide*. Hackenheim: ConchBooks.
- Petrić, J. (2013). Uzgoj hobotnice (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) u kontroliranim uvjetima (diplomski rad). Split: Sveučilište u Splitu, Odjel za studije mora.
- Ricker, W.E. (1979). Growth rates and models. In: W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett (eds), *Fish Physiology* (pp. 677–743). New York: Academic Press.
- Rocha, F., Guerra, A., Prego, R. & Piatkowski, U. (1999). Cephalopod paralarvae and upwelling conditions of Galician waters (NW Spain). *Journal of Plankton Research*, 21(1), 21–33.
- Roper, C.F.E. & Voss, G.L. (1983). Guidelines for taxonomic descriptions of cephalopod species. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44, 49–63.
- Shomrat, T., Turchetti-Maia, A.L., Stern-Mentch, N., Basil, J.A. & Hochner, B. (2011). The vertical lobe of cephalopods: A brain structure ideal for exploring the evolution of advanced learning and memory systems. *Journal of Comparative Physiology A*, 197(10), 933–940.
- Sparre, P. & Venema, C.S. (1998). *Introduction to Tropical Fish Stock Assessment – Part 1: Manual* (FAO Fisheries Technical Paper 306/1, Rev. 2). Rome: FAO.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Vail, A.L., Manica, A. & Bshary, R. (2013). Fish choose appropriately when and with whom to collaborate. *Current Biology*, 23(17), 1640–1644.
- Villanueva, R. (1995). Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 2639–2650.
- Wang, Q., Zhuang, Z., Deng, J. & Ye, Y. (2006a). Stock enhancement and translocation of the shrimp *Penaeus chinensis* in China. *Fisheries Research*, 80, 67–79.
- Wells, M.J. (1978). *Octopus: Physiology and Behaviour of an Advanced Invertebrate*. London: Chapman & Hall.
- Yeh, F., Young, R. & Boyle, T. (2000). POPGENE Version 1.32: A Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Edmonton: University of Alberta.

6.PRILOZI



Slika 1. Anesteziranje hobotnice u hladnoj kupki, prije uzorkovanja tkiva, mjerenja mase i određivanja spola.



Slika 2. Određivanje spola pregledom trećeg desnog kraka, kod mužjaka hektokotilnog kraka.



Slika 3. Prijanjalke mužjaka hobotnice, u crvenom kvadratu se nalazi veća prianjalka u odnosu na susjednu prianjalku, u bijelom kvadratu se nalazi hektokotilni krak (Izvor: D. Vrdoljak)



Slika 4. Ženka (veća) i mužjak (manja jedinka) tijekom kopulacije



Slika 5. Netom položena jaja hobotnice, duljina jajeta cca 5 mm, makro fotografija



Slika 6. Jaja hobotnice s vidljivim embrijima, pigmentirane točke su oči hobotnica.



Slika 7. Netom izvaljena hobotnica, duljina paraličinke cca 3 mm



Slika 8. Ženka žbirca s jajima netom prije izvaljenja zoota.



Slika 9. Zooa raka žbirca.



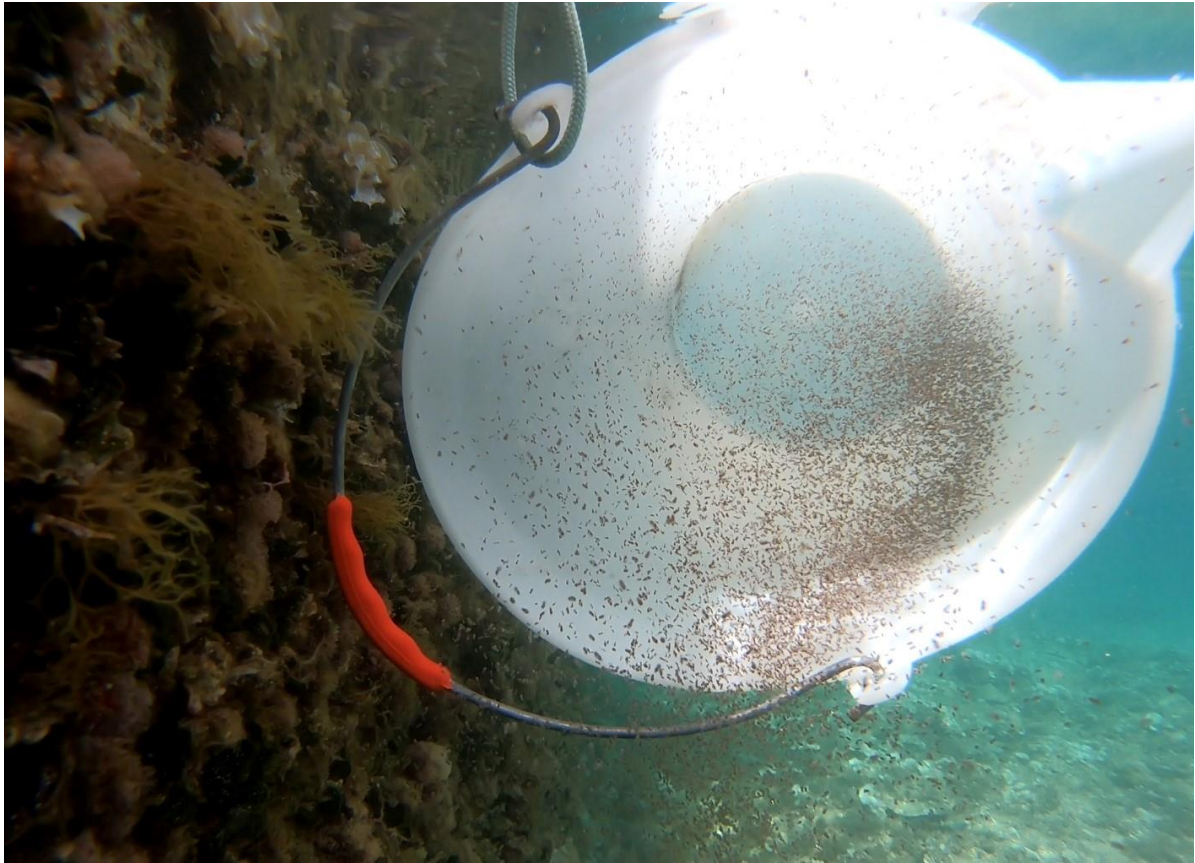
Slika 10. Paraličinka hobotnice se hrani ličinkom raka žbirca.



Slika 11. Paraličinke hobotnice u uzgojnom bazenu.



Slika 12. Bogato pigmentirana paraličinka hobotnice i živi plijen.



Slika 13. Ispuštanje trodnevni paraličinki hobotnica u more.



Slika 14. Kokoni s jajima hobotnice nakon što se izvali većina paraličinki.

