

Prikupljanje i održavanje matičnog jata hobotnice (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) za potrebe repopulacije

Stanić, Lovre

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:725162>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

Lovre Stanić

PRIKUPLJANJE I ODRŽAVANJE MATIČNOG JATA
HOBOTNICE (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) ZA
POTREBE REPOPULACIJE

Diplomski rad

Split, ožujak 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

PRIKUPLJANJE I ODRŽAVANJE MATIČNOG JATA
HOBOTNICE (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) ZA
POTREBE REPOPULACIJE

Diplomski rad

Predmet: Marikultura beskralježnjaka

Mentor:

Doc. dr. sc. Leon Grubišić

Student:

Lovre Stanić

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Morsko ribarstvo

Diplomski rad

PRIKUPLJANJE I ODRŽAVANJE MATIČNOG JATA HOBOTNICE (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) ZA POTREBE REPOPULACIJE

Lovre Stanić

Sažetak

U ovom radu analizirani su glavni čimbenici koji su potrebni za prikupljanje i održavanje matičnog jata hobotnice (*Octopus vulgaris*). Održavanje se temelji na ribolovu nedoraslih jedinki i njihovog uzgoja u zatočeništvu. Drugi dio predmetnog istraživanja se odnosio na mogućnost repopulacije *O. vulgaris*. Istraživanjem su obuhvaćena dva matična jata, prvo matično jato je sakupljeno 2019. a drugo tijekom 2020. godine. Prikupljanje živih hobotnica se obavljalo u akvatoriju s južne strane otoka Brača: u uvalama Smrka i Lučice te uz obale Rta Kobila. Matična jata hranjena su sitnom plavom ribom (*Sardina pilchardus* i *Engraulis encrasicolus*), a tijekom šezdesetodnevnog istraživanja konstantno su praćeni zootehnički parametri. Rezultati rasta i iskoristivosti hrane prikazani su kroz parametre: prirast mase (BWI) $110,62 \pm 31,67\%$, specifična stopa rasta (SGR) $1,22 \pm 0,25\%$, apsolutna stopa rasta (AGR) $9,70 \pm 1,68$ grama, apsolutna stopa ishrane (AFR) $20,54 \pm 1,61$ grama, specifična stopa ishrane (SFR) $2,51 \pm 0,53\%$ i efikasnost hranjenja (FE) $38,28 \pm 9,34\%$. Nakon uspješne kopulacije u 2019. godini tri ženke su početkom lipnja polagale oplođena jaja. Paraličinke su hranjene ranim razvojnim stadijima (zoa) raka žbirca (*Eriphia verrucosa*) 10 dana, nakon čega su puštene u more u blizini Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Prosječna apsolutna plodnost za tri uspješno oplođene ženke iznosila je $302\ 612 \pm 15,80$. Šest mjeseci nakon puštanja prikupljene su 23 jedinke s ciljem testiranja srodnosti s maticama i provjere uspješnosti repopulacije. U predmetnoj studiji, kod ulovljenih potencijalnih potomaka matičnog jata od 23 jedinke dvije su prepoznate (19F1_O_09 i 19F1_O_12). Kao par roditelja prepoznate su jedinke 19F06 i 19M10.

(47 stranica, 27 slika, 10 tablica, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Octopus vulgaris*, ishrana, rast, fekunditet, repopulacija

Mentor: Doc. dr. sc. Leon Grubišić

Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Leon Grubišić

Prof. dr. sc. Svjetlana Krstulović Šifner

Izv. prof. dr. sc. Jasna Maršić Lučić

**CAPTURE AND CONDITIONING OF COMMON OCTOPUS BROODSTOCK
(*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) FOR THE PURPOSES OF REPOPULATION**

Lovre Stanić

Abstract

In this paper the main factors necessary for capturing and conditioning of common octopus broodstock *Octopus vulgaris* were analyzed. Conditioning is based on catching of juveniles and their cultivation in captivity. Second part of the research examines the possibility of *O. vulgaris* repopulation. In the research two broodstocks of the common octopus were included, first one was captured in 2019, and second one was captured in 2020. The collecting of a live samples was done at the south side aquatory of the island Brač in cove Smrka, Lučice and cape Kobila. The broodstockes were fed with small pelagic fish (*Sardina pilchardus* i *Engraulis encrasicolus*), and through 60 days of research zootechnical parameters were continuously monitored. The results of growth and diet were represented through parameters: body weight increase (BWI) $110.62 \pm 31.67\%$, specific growth rate (SGR) $1.22 \pm 0.25\%$, absolute growth rate (AGR) 9.70 ± 1.68 grams, absolute feeding rate (AFR) 20.54 ± 1.61 grams, specific feeding rate (SFR) $2.51 \pm 0.53\%$ and feed efficiency (FE) $38.28 \pm 9.34\%$. In June 2019 after successful copulation, three females laid their eggs. For 10 days paralarvae were fed with zoa of crab (*Eriphia verrucosa*), after wich they were released in front of Institute of Oceanography and Fisheries in Split. Fecundity for three females was $302\ 612 \pm 15.80$. Six months after releasing, 23 octopuses were captured to verify the success of repopulation and DNA test. In the sampled stock of 23 individuals, two were recognized (19F1_O_09 and 19F1_0_12) coming from the couple of parents (19F06 i 19M10).

(47 pages, 27 figures, 10 tables, 51 references, original in: Croatian)

Keywords: *Octopus vulgaris*, diet, growth, fecundity, repopulation

Supervisor: Leon Grubišić, PhD / Assistant Professor

Reviewers: Leon Grubišić, PhD / Assistant Professor

Svjetlana Krstulović Šifner, PhD / Full Professor

Jasna Maršić Lučić, PhD / Associate Professor

Zahvala

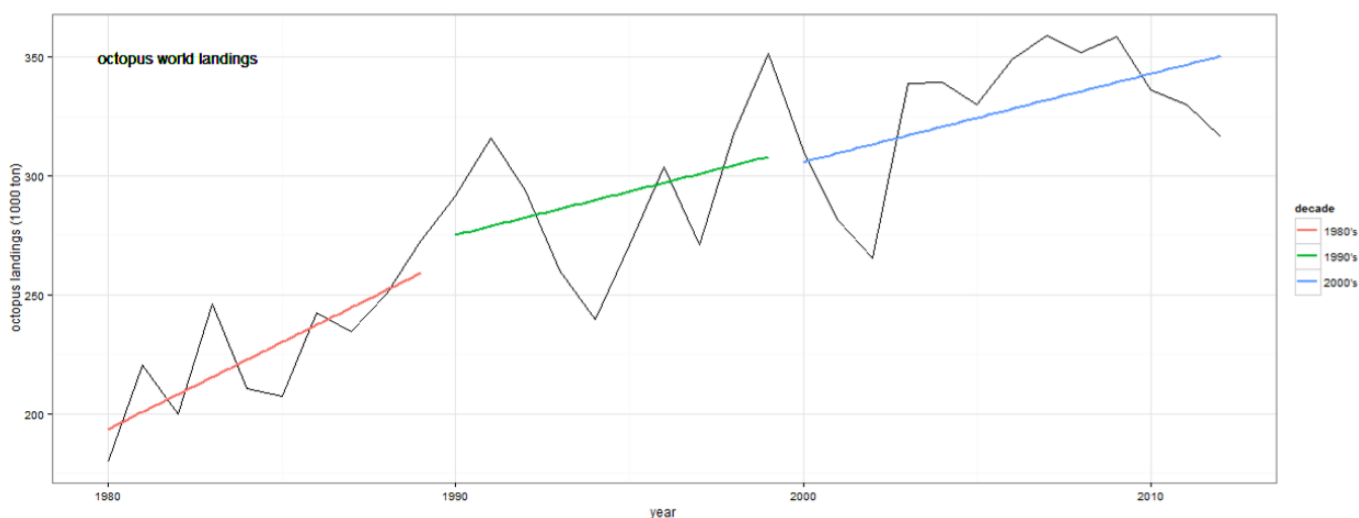
Zahvaljujem svim djelatnicima laboratorija za akvakulturu Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Najveću zahvalu dugujem mentoru doc. dr. sc. Leonu Grubišiću na ukazanoj prilici, svom prenesenom znanju i nesebičnoj pomoći i podršci u izradi ovog rada. Također, hvala i dr. sc. Ivi Žužul Vrgoč na iznimnoj pomoći i stručnim savjetima te kolegici mag. ing. Roberti Frleti na uloženom vremenu, savjetima i podršci.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Opis vrste i dosadašnje spoznaje	2
1.1.1. Mikrosateliti	8
1.3. Ciljevi istraživanja.....	10
2. MATERIJALI I METODE	11
2.1. Prikupljanje matičnog jata.....	11
2.2. Određivanje mase i spola.....	13
2.3. Održavanje matičnog jata hobotnica zatvorenog tipa.....	16
2.4. Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima.....	17
2.5. Rast hobotnice u kontroliranim uvjetima	20
2.6. Ekološki uvjeti za vrijeme održavanja matičnog jata.....	20
2.7. Reprodukcijska u eksperimentalnim uvjetima.....	21
2.8. Hranjenje, održavanje i puštanje paraličinki u more	22
2.9. Prikupljanje jedinki za provjeru uspješnosti repopulacije	23
2.10. DNK izolacija.....	25
2.11. Genotipizacija mikrosatelitnih biljega.....	25
2.11.1. Izbor mikrosatelitnih biljega.....	25
2.11.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	25
2.12. Statistička analiza podataka.....	26
2.12.1. Statistička analizi mikrosatelitnih podataka	26
3. REZULTATI I RASPRAVA	28
3.1 Rezultati prikupljana matičnog jata.....	28
3.2 Rast hobotnice u kontroliranim uvjetima	30
3.3 Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima.....	34
3.4 Fekunditet.....	37
3.5 Genetska raznolikost hobotnice (<i>Octopus vulgaris</i>) i analiza srodnosti.....	38
4. ZAKLJUČCI	41
4. LITERATURA	43

1. UVOD

U posljednjih 40 godina ulov glavonožaca se kontinuirano povećava. Povećan interes uslijedio je nakon kontinuiranog pada ulovnih količina ribe te su se glavonošci počeli intenzivnije koristiti kao alternativni izvor proteina iz mora u ljudskoj prehrani (Jereb i sur., 2014). Hobotnice koje uglavnom pripadaju obitelji Octopodidae, značajan su biološki resurs za male ribarske zajednice, kao i neke veće ribarske flote (Fonseca i sur., 2008). Statistički podatci od 1950-ih godina do danas ukazuju na globalni porast godišnjeg ulova hobotnice (FAO, 2011-2014). Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) procijenila je da se između 2002. i 2012. godine prosječno izlovalo 334 033 tona hobotnica godišnje diljem svijeta (FAO, 2011-2014). Međutim, od 2009. godine ulov hobotnice se smanjuje, a 2012. zabilježen je ulov od 316 582 tona (Slika 1). Nedovoljno specifična evidencija ulova hobotnica po vrstama u nekim zemljama predstavlja glavni problem u evidenciji, što rezultira manjkom podataka o važnosti vrste *Octopus vulgaris*. U području istočnog Atlantika i Sredozemlja, komercijalno najvažnija vrsta je *O. vulgaris* (Pierce i sur., 2010).



Slika 1. Grafički prikaz dinamike godišnjih svjetskih ulova različitih vrsta hobotnica (rod *Octopus*) između 1980. i 2012. Pravci pokazuju tendenciju ulova po desetljeću (izvor: FAO, 2014).

Zbog znatnog ribolovnog pritiska, velike potražnje na europskom tržištu i visoke tržišne vrijednosti, hobotnice možemo svrstati u grupu visoko pozicioniranih kandidata za uvođenje u uzgoj ili za potrebe repopulacije (Iglesias i sur., 2004). Hobotnice karakterizira brza i laka prilagodba na život u zatočeništvu, akvarijima ili različitim oblicima kaveza (Iglesias i sur., 2000). Pored dobre prilagodbe na zatočeništvo, hobotnice imaju i niz drugih poželjnih uzgojnih karakteristika. Najvažnije prilagodbe ove vrste su visoka otpornost na transport i stres tijekom rukovanja uz iznimno brz prirast mase u zatočeništvu, čak veći od 5% tjelesne mase dnevno (Villanueva, 1995). Kod uravnoteženog hranjenja bogatog bjelančevinama dolazi do visoke stope iskoristivosti hrane u rasponu od 40% do 60% (Mangold i Boletzky, 1973; Mangold, 1983). Međutim, jedna od najvažnijih poželjnih karakteristika hobotnica u zatočeništvu je reprodukcija. U istraživanju koje su proveli Casalini i sur. (2020), potvrđeno je da hobotnice u zatočeništvu mogu imati uspješnost reprodukcije veću od 90% što potvrđuje rezultate Iglesiasa i Fuentesasa (2014) koji su zabilježili stopu reprodukcije veću od 80%.

1.1. Opis vrste i dosadašnje spoznaje

Svi glavonošci koji trenutno obitavaju u morima i oceanima, uključujući lignje, sipe i hobotnice, pripadaju podrazredu Coleoidea (Boyle i Rodhouse, 2006; Kröger i sur., 2011). Opisani nalazi i molekularne studije pokazuju da su Coleoidea evoluirale zajedno sa sestrinskom skupinom Nautiloidea u kasnom paleozoiku, prije 276 milijuna kada su zbog kompeticije zauzeli dublje dijelove vodenog stupca. Prilagodba na život pod utjecajem visokog pritiska rezultirala je gubitkom vanjskog oklopa, što je omogućilo zauzimanja bentopelagičnih staništa (Kröger i sur., 2011). Ranjivost na predatore se povećala jer je izostala zaštitna funkcija oklopa, međutim opstali su tadašnji glavonošci koji su se prilagodili jer su dobili bolju sposobnost plivanja. Zbog povećanja pokretljivosti i fizičke aktivnosti, dolazi do potrebe za korištenjem veće količine energije i ubrzanja metabolizma. Krvožilni sustav je zatvoren, s dva razgranata srca smještena na bazama škrge kako bi se poboljšala cirkulacija unutar škrge i sistemskog srca. Učinkovitija ventilacija škrge omogućila je stvaranje složenije muskulature u šupljini plašta što je dovelo do razvoja primitivne komore za pokretanje na mlazni pogon (Boyle i Rodhouse, 2006). Uz brže plivanje i bolju okretnost, glavonošci su razvili i sofisticiranije senzorne sustave, osobito oči i dobro razvijeni mozak (Nixon i Young, 2003).

Jedna od poznatijih prilagodbi kod glavonožaca, a osobito hobotnice, je mimikrija koja im omogućuje učinkovito skrivanje od predatora i pomaže pri vrebaju plijena (Slika 2). Mimikrija je sposobnost mijenjanja boje koja ovisi o stezanju i rastezanju kromatofora pomoću posebnih mišićnih stanica. Kromatofori su pod utjecajem živčanog sustava koji kontrolira rastezanje/stezanje (Matoničkin, 1998). Druga poznata obrambena strategija kod hobotnica je ispuštanje crnila. Vrećica s crnilom nalazi se s ventralne strane trbušnih organa. Kada se hobotnica nađe u opasnosti, kroz sifon izbacuje crnilo te tako zbuni neprijatelja dok se ne skloni na sigurno. Crnilo je bogato tirozinom koje može iritirati oči i privremeno paralizirati njušni organ neprijatelja (Franetović, 2002).



Slika 2. Hobotnica se kamuflirala u bentosku podlogu, u ovom slučaju pijesak (izvor: <https://www.telegraph.co.uk/news/picturegalleries/earth/3247746/Animals-disappear-using-camouflage.html?image=7>).

Hobotnica (*Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797) je bentoska vrsta koja obitava u moru od obale do vanjskog ruba kontinentalnog šelfa, na dubinama od 0 do 200 m. Nastanjuje različita staništa poput stijena, koraljnih grebena i morskog raslinja. Hobotnica je stenohalina vrsta pa je iz tog razloga nema u brakičnim područjima, a pad temperature morske vode ispod 7°C rezultira usporavanjem metabolizma te smanjenim kretanjem. Tijelo *O. vulgaris* je bilateralno

simetrično i mišićavo, a na glavi se nalazi 8 krakova koji mogu dosegnuti i do 3 metra duljine. Na svakom kraku smještene su prijanjalke koje su raspoređene u dva niza. Na krakovima mužjaka vidljivo je nekoliko većih prijanjaljki u odnosu na ostale, što kod ženki nije slučaj. Treći desni krak kod mužjaka je hektokotiliziran modifikacijom vrška u žličasti jezičac – ligulu, koji služi kao organ pri kopulaciji (Slika 3).



Slika 3. Hektokotilizirani krak mužjaka hobotnice.

Razmnožavanje hobotnice je klasificirano kao simultano terminalno, semelparne su, a oplodnja je unutrašnja. Spolno sazrijevanje se uglavnom događa između 12 i 18 mjeseca starosti (Roper i sur., 1983). Prosječno vrijeme kopulacije traje od 30 minuta do nekoliko sati. Kada je ženka nakon određenog vremena spremna za oplodnju, koristi spermatozoide samo jednog mužjaka koji će osigurati najbolji genetički materijal za buduće potomstvo. Hobotnica se razmnožava jednom tijekom životnog ciklusa (Rocha i sur., 1999). Obično se ženke same brinu o jajima, a umiru nakon izvaljenja svih paraličinki iz jaja. U Sredozemnom moru zabilježena su dva perioda mrijesta godišnje. Prvi period se javlja u razdoblju između travnja i lipnja, a drugi u listopadu. Ženke *O. vulgaris* mogu proizvesti od 100 000 do 500 000 jaja

(Mangold, 1983). Prije procesa razmnožavanja, opaženo je udvaranje mužjaka prezentiranjem hetokotiliziranog kraka. Kopulacija započinje ubacivanjem hektokotiliziranog kraka u unutrašnju šupljinu plašta ženke, a zatim dolazi do deponiranja u jajovod ženke spermatofora u kojima se nalaze spermatozoidi. Prije mriješta ženke se skrivaju u skloništa, a nakupine jaja, u obliku grozdova, postavljaju na stropove odabranog skloništa, a u kontroliranoj sredini na zidove, cijevi ili kutije (Iglesias i sur., 2000). Za vrijeme inkubacije, ženke se ne hrane i ne izlaze iz skloništa u kojem su postavile jaja.

Red Octopodidae sadrži najveći broj poznatih vrsta hobotnice. Kod nekih svojiti netom izvaljene jedinke su razvijene, morfološki i funkcionalno slične adultima, odmah se spuštaju u bentos poput odraslih jedinki te se zbog toga nazivaju juvenili (Villanueva, 1995). Međutim, to nije slučaj kod *O. vulgaris* koja ima planktonsku fazu koju su Young i Harman (1988) nazvali paralaličinke. U planktonskoj fazi duljina plašta (ML) je oko 2 mm (Boletzky, 1987). Embriogeneza traje od četiri do dvanaest tjedana. Inkubacija tijekom embrionalnog razvoja ovisi o više čimbenika, od kojih su najznačajniji veličina jaja i temperatura mora. Povišena temperatura mora skraćuje trajanje inkubacije. Iz jaja se nakon inkubacije izvaljuju paraličinke ili paralarve. Planktonski stadij hobotnica, pri temperaturi od 21 °C, traje oko osam tjedana (Villanueva, 1995). Za vrijeme planktonske faze hrane se zoeama dvaju vrsta rakova, *Liocarcinus depurator* i *Pagurus prideaux*, ili drugim razvojnim stadijima rakova. Nakon planktonskog stadija slijedi stadij mlađi. Za ovaj stadij karakteristična je preobrazba paraličinki, prestanak plivanja, sve češći boravak u bentosu te početak kretanja kao u odraslih jedinki. Bentoski način života nastupa kada mlada hobotnica dosegne minimalnu duljinu plašta od 7,5 mm, neovisno o temperaturi okoliša ili starosti (Villanueva, 1995 ; Cinoti, 2007) (Slika 4). Uspješan uzgoj *O. vulgaris*, od izvaljenja paraličinki do premještanja na bentos, zabilježen je u istraživanju Villanueve (1995), gdje je stopa preživljavanja nakon 40 dana, pri srednjoj temperaturi vode 21,2 °C, iznosila je 32,1%.



Slika 4. Prikaz paraličinki hobotnica različitih starosti. (Izvor: L. Grubišić).

Hobotnica je svestrani grabežljivac i izraziti predator (Mather i O'Dor, 1991). U prirodi svoj plijen pronalazi na više načina: vizualno - nasumičnim traganjem uz pomoć vršnih dijelova svojih krakova ili ispuhivanjem mlaza vode iz lijevka kako bi otkrila plijen ukopan u sedimentu. Svi glavonošci, pa tako i hobotnica, imaju karakterističnu osjetljivost na kemijske podražaje. Kemorepcijom se koristi pomoću kemoosjetilnih stanica smještenih na usnom polju i prianjalkama (Budelmann, 1996), a služi joj za socijalnu komunikaciju i za detektiranje plijena na većim udaljenostima. Iako preferira živu hranu, u zatočeništvu se može prilagoditi na prihvaćanje mrtve hrane poput komadića rakova, riba ili mekušaca. Hobotnica preferira sporije konzumiranje hrane te se takav način hranjenja mora poštovati tijekom hranjenja u zatočeništvu. Veća aktivnost *O. vulgaris* zabilježena je tijekom noći i sumraka (Boucaud-Camou i Boucher-Rodoni, 1983). Kako se hobotnice tijekom svog života najčešće nalaze u bentosu, nije neobično što pokazuju negativan fototaksizam. Štoviše, Mather (1994) je zabilježio veću stopu rasta kod jedinki koje su imale mjesto za skrivanje u koje svjetlo nije prodiralo .

Industrijski uzgoj hobotnice u plutajućim kavezima bio je predviđen krajem devedesetih godina dvadesetog stoljeća (Iglesias i sur., 2000). Danas je to ostvareno u Španjolskoj, gdje neke tvrtke uzgajaju *O. vulgaris* sa stopama rasta od 0,3 do 0,8 kilogramu u jednom mjesecu i stopom smrtnosti od 5,7%. Uzgajane hobotnice su hranjene odmrznutim srdelama (*Sardina pilchardus*), bukvama (*Boops boops*), skušama (*Scomber scombrus*) i

dagnjama (*Mytilus* sp.). U uzgoju se preporučuje razdvajanje po spolovima kako ne bi došlo do kopulacije. Naime, neosjemenjene ženke hrane se intenzivnije, bolje iskorištavaju ponuđenu hranu te nastavljaju rasti do komercijalne veličine. Mužjaci većinom rastu brže od ženki te dostižu prosječnu masu od 3 kilograma, dok ženke postižu masu od 2,5 kilograma. Optimalna temperatura mora za rast *O. vulgaris* je između 16 °C i 21 °C, s prosječnom temperaturom od 17,5 °C. Na temelju tih čimbenika, u Europi raste interes za korištenjem recirkulacijskog sustava akvakulture (RAS) koji bi omogućio potpunu kontrolu razmnožavanja u zatočeništvu. Sukladno tome, moraju se razriješiti mnogi tehnički nedostaci povezani s trenutno prisutnim tehnikama i znanjima da bi se moglo razmišljati o industrijskim razmjerima. Jedna od komponenti koja zahtjeva dodatno istraživanje je razvoj prehrane za matično jato, koja može pozitivno utjecati na povećanje fekunditeta. Nažalost, mali broj studija je istraživao učinke prehrane u svrhu povećanja reproduktivne sposobnosti, što predstavlja fekunditet koji se definira brojem dobivenih jaja i paralarvi (Casalini i sur., 2020). Primjerice, Kolkovski (2009) je u svom istraživanju ispitao mogućnost repopulacije *Octopus tetricus* na području zapadne Australije, dok za vrstu *O. vulgaris* mogućnost repopulacije još uvijek nije dovoljno istražena u Jadranskom moru. Potreba za obnavljanjem prirodnih populacije glavonožaca repopulacijom proizašla je na temelju zabrinjavajućih spoznaja o prelovljenosti prirodnih resursa te potrebom za očuvanjem prirodnih staništa. Predatori su najveća prepreka uspješnom preživljavanju ispuštenih nedoraslih jedinki u more. Stopa preživljavanja se može znatno povećati puštanjem nedoraslih jedinki u područja u kojima je abundancija predatora manja ili u vrijeme kada je smanjena (Blankenship i Leber, 1995). Pretjerano ispuštanje nedoraslih jedinki može uzrokovati smanjenje matičnog stoka, kao u slučaju repopulacijskih stokova kozice *Penaeus japonicus* i *Penaeus chinensis* u Japanu i Kini, nakon velikog ispuštanja nedoraslih jedinki (Hamasaki i Kitada, 2006; Wang i sur., 2006a). Planirani broj nedoraslih jedinki za repopulaciju ovisi o razumijevanju ekologije ciljane vrste i o nosivom kapacitetu ekosustava. Visoka stopa preživljavanja puštene mlađi na jednom lokalitetu ne jamči uspješnost metode i na drugim područjima. Umjetna staništa mogu se koristiti za povećanje kapaciteta nosivosti određene vrste te mogu pomoći nedoraslim jedinkama pri skrivanju od predatora. Prednost repopulacije su znatno niži troškovi u odnosu na uzgoj. Obnavljanje prirodnih staništa repopulacijom neće polučiti očekivani rezultat, ako se ne provedu mjere zaštite prirodnih populacija i tek puštene nove mlađi do ciljane biomase. Često je vrlo velik broj nedoraslih jedinki potreban za učinkovito povećanje matičnog stoka, čak i u područjima gdje se mogu pustiti deseci milijuna nedoraslih jedinki. Rezultati neće imati utjecaj na povećanje matičnog stoka, a time ni na povećanje ulova ribolovom. Stoga, bi znanstvenici trebali odrediti prosječnu prirodnu smrtnost

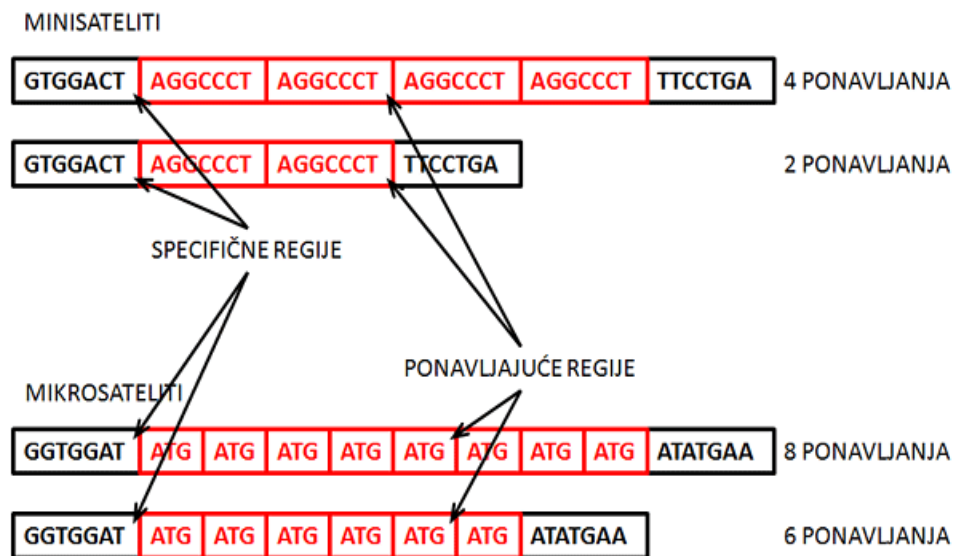
i brzinu rasta ciljane vrste te odrediti kapacitet nosivosti za različite dobne razrede tako da postignu povećanje matičnog stoka svake godine (Bell i sur., 2005). Problemima kao što su socijalna, ekonomska i biološka raznolikost, također je potrebno dati jednaku važnost u procjeni potencijalne uloge obnavljanja ili povećavanje matičnog jata. Programi moraju biti društveno prihvatljivi, ekonomski i ekološki održivi (Devin i Johann, 2008). Osnovni koraci takvog pristupa su:

- Procjena statusa svake populacije koja je održiva, obuhvaćajući razinu eksploatacije ribolovom i specifične ciljeve za poboljšanje produktivnosti ciljane vrste.
- Modeliranje prednosti ispuštanja nedoraslih jedinki u svrhu postizanja ciljeva u usporedbi s drugim oblicima upravljanja.
- Nastaviti s repopulacijom nedoraslim jedinkama jedino u slučaju očekivane koristi te ako je postignuta educiranost ribara i prihvaćanje programa.
- Praćenje ishoda i prilagodba upravljanja radi poboljšanja isplativosti puštanja nedoraslih jedinki.

1.1.1. Mikrosateliti

Mikrosateliti, jednostavne sekvence ponavljanja (engl. *simple sequence repeats*, SSR), prvobitno su dizajnirani za istraživanje degenerativnih i neuroloških bolesti kod ljudi, ali kasnije su zbog jednostavne primjene i informativnosti, postali jedan od najpopularnijih molekularnih biljega u istraživanjima koja proučavaju migracijske stope, veličine populacija i srodnost (Selkoe i Toonen, 2006). To su dijelovi DNA koji se sastoje od uzastopnih ponavljanja mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ili heksanukleotida, raspoređenih kroz genom većine eukariota (Powell i sur., 1996). Mikrosateliti su kodominantni biljezi i omogućavaju razlikovanje homozigotnih i heterozigotnih genotipova, u usporedbi s RAPD i AFLP biljezima koji utvrđuju prisustvo tj. odsustvo pojedinog lokusa (Hoshino i sur., 2012). Prednost upotrebe mikrosatelita kao molekularnih biljega je jeftina i jednostavna detekcija putem PCR-a. Stabilnost DNA u usporedbi s enzimima dopušta upotrebu jednostavnih tkivnih konzervansa za pohranu, kao što je 95% etanol (Hoshino i sur., 2012). Mnogi mikrosateliti imaju visoku stopu mutacija (između 10^{-2} i 10^{-6} mutacija po lokusu po generaciji) koja generira visoku stopu alelne raznolikosti potrebne za genetska istraživanja. Usprkos mnogim prednostima, mikrosatelitni biljezi imaju i neke nedostatke u primjeni, poput ograničenja homoplazijom i nul-alelima, što otežava analizu

podataka. Posljedica mutacija u bočnim regijama su nul-aleli, što ometa nasjedanje početnica, zbog čega amplifikacija alela izostaje. Homoplazija podrazumijeva prisustvo alela koji su jednaki po duljini, ali ne i po podrijetlu. Također, jedan od nedostataka mikrosatelitnih biljega su visoki troškovi dizajna početnica. Kod nedovoljno istraženih vrsta uporaba mikrosatelita je limitirajuća jer su početnice vrsno specifične. Iste početnice se mogu koristiti kod filogenetski bliskih vrsta, kao u slučaju trlje blatarice *Mullus barbatus* i trlje kamenjarke *Mullus surmuletus* (Galarza i sur., 2007) uz prethodnu provjeru polimorfnosti lokusa.



Slika 5. Shematski prikaz mikrosatelita (Izvor: <http://www.rodoslovlje.hr/istaknuta-vijest/utvrdivanje-srodnosti-molekularno-bioloskim-metodama>).

1.3. Ciljevi istraživanja

Svrha predmetnog rada je prezentacija rezultata istraživanja o mogućnosti prikupljanja i održavanja matičnog jata hobotnica koje se temelji na ribolovu nedoraslih jedinki i njihovom uzgoju u zatočeništvu. Kako bi se procijenila mogućnost održavanja matičnog jata hobotnice i repopulacija ove vrste, zadano je više ciljeva:

- (1) Utvrditi mogućnost ulova i transporta živih hobotnica za daljnji uzgoj.
- (2) Istražiti mogućnost održavanja matičnog jata hobotnica u kontroliranim uvjetima.
- (2) Testirati mogućnost održavanja matičnog jata hobotnica i ishrane na bazi sitne pelagičke ribe.
- (4) Testirati mogućnost hranjenja i uzgoja paraličinki hobotnice
- (5) Istražiti uspješnost repopulacije ispuštanjem juvenilnih jedinki u okoliš.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Prikupljanje matičnog jata

Ovaj diplomski rad obuhvaća rezultate dvaju istraživanja provedenih tijekom 2019. i 2020. godine. Prvo sakupljanje matičnog jata obavljeno je u veljači 2019. godine, u akvatoriju južne strane otoka Brača u uvalama Smrka, Lučice i uz obale Rta Kobila. Za potrebe prikupljanja angažirani su lokalni ribari iz Milne. Za prikupljanje živih hobotnica koristio se isključivo ribarski alat zvan panula, jednostavne konstrukcije koji se sastoji od motovila na kojem se nalazi monofilamentna struna promjera 2 mm, na čijem slobodnom kraju se nalazi mamac i olovo. Žive hobotnice su ubrzo nakon ulova transportirane u uzgojne bazene eksperimentalnog mrijestilišta Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Drugo sakupljanje matičnog jata obavljeno je 13.3.2020. motornom brodicom „Navicula“ s Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu na području Brača u uvalama Smrka, Lučica i uz obalu Rta Kobila. Lov živih jedinki obavljen je istim alatom, a za mamac su korištene bukva (*Boops boops*) ili šarun (*Trachurus trachurus*) (Slika 6).



Slika 6. Mamac na panuli korišten za vrijeme lova.

Lov je obavljen tako da bi dvoje ljudi na krmi broda (Slika 7) vuklo panulu po morskom dnu, na dubinama između 5 i 20 metara. Brzina povlačenja panule za brodicom je postignuta minimalnim korištenjem motora ili korištenjem lokalnih morskih struja i vjetra. Nakon što se hobotnica prikačila za mamac na panuli, laganim ručnim povlačenjem se jedinka dovela blizu površine mora gdje bi se korištenjem janke podigla iz mora. Ulovljene hobotnice, smještene su u vreće napravljene od mrežnog tega te u transportni bazen (Slika 8). Korištene su vreće od mrežnog tega kako bi se izbjegla mogućnost bijega jedinki, mehanička oštećenja ili kanibalizma. More u transportnom bazenu izmjenjivalo se svakog sata tijekom transporta. Korištena tehnika osigurala je maksimalnu stopu preživljavanja unatoč duljem ribolovu i transportu. Transport je također izvršen brodicom „Navicula“ u eksperimentalno mrijestilište Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.



Slika 7. Lov panulom na krmi broda „Navicula“.



Slika 8. Transportni bazen s hobotnicama koje su odvojene u vrećama mrežnog tega
(Izvor: J. Petrić).

2.2. Određivanje mase i spola

Po dolasku na Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, obavljena je biometrija jedinki pri čemu se odredila masa, spol te je manji uzorak tkiva uzet za daljnju genetičku obradu. Zbog dobrobiti životinja, smanjenja boli i stresa, a prema protokolu u posudu s morem postavljeni su smrznuti ulošci. Kada se temperatura mora spustila na 3 °C, u posudu su dodane hobotnice, a nakon nekoliko minuta jedinke su bile omamljene. Sedirane hobotnice postavljene su u manju posudu s morem te se vizualnim pregledom krakova odredio spol. Nakon određivanja spola, kirurškim nožicama izuzet je manji dio tkiva s kraka te je pohranjeno u 95%-tnom etanolu za daljnju genetičku obradu. U istraživanju su korišteni kavezi uniformne mase, a masa jedinki određena je iz razlike mase jedinki s kavezom i mase praznog kaveza. Određivanje mase uzgajanih hobotnica provodilo se svakih 20 dana (Slika 9).



Slika 9. Određivanje mase, vaganjem hobotnica s kavezom.

Tablica 1. Podatci o uzorcima hobotnice, *O. vulgaris* uključeni u istraživanje (broj uzoraka, period uzorkovanja, spol i odgovarajuće mase uzorkovanih jedinki u trenutku ulova)

Broj uzoraka	Populacijska oznaka jedinke	Period	Spol	Masa (g)	Poulacijska oznaka jata
1	19M01	14.02.2019.	M	374	19F0_M
2	19M02	14.02.2019.	M	326	
3	19M03	14.02.2019.	M	298	
4	19M04	14.02.2019.	M	456	
5	19M05	14.02.2019.	M	380	
6	19M06	14.02.2019.	M	330	
7	19M07	14.02.2019.	M	262	

8	19M08	14.02.2019.	M	302		
9	19M09	14.02.2019.	M	545		
10	19M10	14.02.2019.	M	465		
11	19M11	14.02.2019.	M	394		
12	19M12	14.02.2019.	M	248		
13	19F01	14.02.2019.	F	555		19F0_Z
14	19F02	14.02.2019.	F	208		
15	19F03	14.02.2019.	F	388		
16	19F04	14.02.2019.	F	388		
17	19F05	14.02.2019.	F	368		
18	19F06	14.02.2019.	F	1075		
19	19F07	14.02.2019.	F	430		
20	19F08	14.02.2019.	F	475		
21	19F09	14.02.2019.	F	290		
22	19F10	14.02.2019.	F	550		
23	20M01	09.03.2020.	M	445	20F0_M	
24	20M02	09.03.2020.	M	405		
25	20M03	09.03.2020.	M	435		
26	20M04	09.03.2020.	M	395		
27	20M05	09.03.2020.	M	475		
28	20M06	09.03.2020.	M	800		
29	20M07	09.03.2020.	M	705		
30	20M08	09.03.2020.	M	310		
31	20M09	09.03.2020.	M	755		
32	20F01	09.03.2020.	F	420		20F0_Z
33	20F02	09.03.2020.	F	670		
34	20F03	09.03.2020.	F	495		
35	20F04	09.03.2020.	F	1230		
36	20F05	09.03.2020.	F	435		
37	20F06	09.03.2020.	F	680		

2.3. Održavanje matičnog jata hobotnica zatvorenog tipa

Jedinke su uzgajane u bazenima kružnog oblika volumena 12 m³, a u svaki bazen je smješteno 6 jedinki, istog spola, unutar plastičnih kaveza. (Slika 10). Svakoga dana se pet puta ukupni volumen bazena izmjenjivao svježom morskom vodom. Tijekom uzgoja svakodnevno su praćeni abiotički parametri uzgojne sredine: temperatura mora i otopljeni kisik. Kavezi u kojima su se nalazile hobotnice su bili pravokutnog oblika, prošarani s mnogo otvora koji su omogućavali nesmetanu cirkulaciju vode, dok se gornji dio kaveza mogao lako otvoriti za potrebe hranjenja i vađenja nepojedene hrane (Slika 11).



Slika 10. Na lijevoj slici je prikaz bazena u kojim su se nalazili kavezi sa ženkama, a na desnoj slici je prikaz bazena u kojem su se nalazili kavezi s mužjacima.



Slika 11. Prikaz hobotnice u plastičnom kavezu.

2.4. Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima

U svrhu istraživanja mogućnosti hranjenja i održavanja jata hobotnica, korišteni su ponajviše srdela (*Sardina pilchardus*) i inćun (*Engraulis encrasicolus*) (Tablica 1). Većina potrebne ribe nabavljena je s ribarskog broda plivarice “Sardina II”. Zbog velike zaprimljene količine, riba bi se konzervirala smrzavanjem na temperaturi od -20°C . Prije hranjenja, riba je odmrznuta u tekućoj morskoj vodi, zatim je izvagana zasebno za svaku jedinku. Prije svakog sljedećeg hranjenja, sakupljena je nepojedena hrana kojoj je određena masa. Hranjenje jedinki obavljeno je u razdoblju od 17.3.2020. godine do 12.5.2020. godine, a jedinke su hranjene svaki dan u isto vrijeme osim vikendima i na dan obavljanja biometrije.

Tablica 2. Udio vrsta sitnih pelagičkih riba u obroku kojim su hranjene hobotnice tijekom istraživanja.

Vrste pelagičkih riba	Udio u obroku (%)
srdela (<i>Sardina pilchardus</i>)	75%
inćun (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	15%



Slika 12. Određivanje mase srdela (*Sardina pilchardus*) prije hranjenja.

U svrhu procjene utjecaja hranjenja, odabrani su različiti parametri iskoristivosti hrane: masa probavljene hrane (engl. *Ingested Food*, IF), apsolutna stopa hranjenja (engl. *Absolute Feeding Rate*, AFR), specifična stopa ishrane (engl. *Specific Feeding Rate*, SFR) i efikasnost hranjenja (engl. *Feed Efficiency*, FE). Također, određen je indeks konverzije hrane (engl. *Food*

conversion rate) koji predstavlja jediničnu masu utrošene hrane potrebne za prirast u tjelesnoj masi uzgajane hobotnice, a određen je po metodi indeksa konverzije hrane (Ricker, 1979). Masa probavljene hrane (**IF**) se izračunava prema izrazu:

$$\mathbf{IF = Fs - Fp} \quad (2.4.1)$$

vrijednost IF je razlika između mase ponuđene i neprobavljene hrane.

Apsolutna stopa ishrane (**AFR**) predstavlja dnevnu količinu utrošene hrane za promatrani period i izračunava se prema izrazu:

$$\mathbf{AFR = IF/t} \quad (2.4.2.)$$

vrijednost t predstavlja dužinu trajanja uzgoja u danima, a IF je gore opisana kao ukupna masa probavljene hrane.

Specifična stopa ishrane (**SFR**) predstavlja vrijednost u postotku dnevne porcije hrane u odnosu na masu uzgajanih organizama i opisana je izrazom:

$$\mathbf{SFR = AFR \times 100 / Wa} \quad (2.4.3.)$$

vrijednost Wa predstavlja prosječnu masu uzgajanih organizama u promatranom razdoblju.

Efikasnost hranjenja (**FE**) predstavlja postotak iskorištenosti utrošene hrane u promatranom razdoblju, a izračunava se prema izrazu:

$$\mathbf{FE = (Wt - Wo) \times 100/IF} \quad (2.4.4.)$$

vrijednosti Wt predstavlja masu hobotnica na kraju uzgojnog razdoblja, a Wo predstavlja masu hobotnica na početku uzgojnog razdoblja. Vrijednosti IF je ranije opisana.

Izračunat je indeks konverzije hrane (**FCR**) koji predstavlja jediničnu masu utrošene hrane potrebne za prirast u tjelesnoj masi uzgajanog organizma, a izračunava se prema izrazu:

$$\mathbf{FCR = F/ (Wt-Wo)} \quad (2.4.5.)$$

vrijednost F predstavlja vrijednost ukupno utrošene hrane, a vrijednosti Wt i Wo su opisane u gornjim izrazima.

2.5. Rast hobotnice u kontroliranim uvjetima

Procjena rasta morskih organizama pretežito se prikazuje kao godišnji prirast mase ili duljine jedinki u jedinici vremena (Sparre i Venema, 1998). Sukladno tome, rast hobotnica u provedenim istraživanjima opisan je pomoću sljedećih parametara: prirast mase (engl. *Body Weight Increase*, **BWI**), specifična stopa rasta (engl. *Specific Growth Rate*, **SGR**) i apsolutna stopa rasta (engl. *Absolute Growth Rate*, **AGR**).

Prirast mase (**BWI**) predstavlja postotak ukupnog prirasta mase uzgajanih hobotnica za vrijeme uzgojnog razdoblja, a određuje se prema izrazu:

$$\mathbf{BWI} = [(W_t - W_o) / W_o] \times 100 \quad (2.5.1.)$$

Vrijednosti W_t i W_o su opisane u gornjim izrazima.

Specifična stopa rasta (**SGR**) predstavlja postotak dnevnog prirasta mase uzgajanih hobotnica, a određuje se prema izrazu:

$$\mathbf{SGR} = (\ln W_t - \ln W_o) \times 100 / t \quad (2.5.2.)$$

Vrijednosti W_t i W_o opisane su u gornjem izrazu, a t je vrijeme trajanja uzgoja u danima.

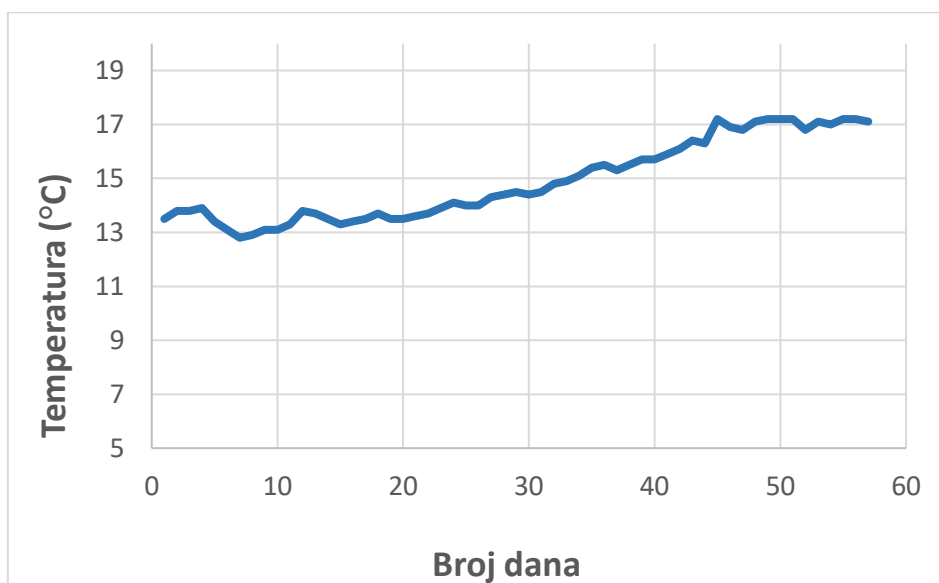
Apsolutna stopa rasta (**AGR**) kazuje kolika je bila vrijednost dnevnog prirasta u mjernoj jedinici, a određuje se prema izrazu:

$$\mathbf{AGR} = W_t - W_o / t \quad (2.5.3.)$$

Vrijednosti W_t , W_o i t su opisane u gornjim izrazima.

2.6. Ekološki uvjeti za vrijeme održavanja matičnog jata

Temperatura je jedan od glavnih okolišnih parametara za razvoj i održavanje matičnog jata hobotnica i reprodukcije. Analognim termometrom je praćena temperatura za vrijeme cijelog istraživanja. U periodu od ožujka do svibnja do kada je istraživanje trajalo temperatura mora se kretala od 12,8 °C do 17,2 °C, s prosječnom temperaturom od 14,9 °C ± 1,48 °C (Slika 13).



Slika 13. Kretanje temperature mora u bazenima tijekom istraživanja.

2.7. Reprodukcija u eksperimentalnim uvjetima

Nakon perioda od 60 dana uslijedilo je prebacivanja ženki u veće bazene. Sve ženke su puštene iz plastičnih kaveza u zasebne bazene volumena 12 m³ u koje su postavljene polipropilenske cijevi dužine 1 metra i promjera 0,22 metra. S jedne strane cijevi su bile zatvorene, a na drugoj strani otvorene. Cijevi su bile perforirane otvorima promjera 20 mm da bi protok svježje morske vode bio osiguran. Funkcija cijevi je bila isključivo da služe kao sklonište, da se hobotnica može sakriti i položiti jaja nakon kopulacije. U svrhu kopulacije provelo se ubacivanje mužjaka u bazen sa ženkom (Slika 14). Zbog kanibalizma koji se nakon kopulacije pojavi među jedinkama, donesena je odluka o odvajanju mužjaka od ženki nakon završene kopulacije. Mužjak je nakon kopulacije izvađen iz bazena sa ženkom i vraćen u svoj kavez.



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

2.8. Hranjenje, održavanje i puštanje paraličinki u more

Tijekom istraživanja provedenog 2019. godine, kopulacija je bila uspješna. Nakon kopulacije, početkom lipnja ženke su odlagale jaja u obliku grozda u skloništa koja su postavljena u bazenu. Za vrijeme inkubacije, hobotnice nisu izlazile iz skloništa, nisu se hranile te su nedugo nakon izvaljenja paraličinki uginule. Tri ženke imale su uspješnu oplodnju, a bazeni u kojima su se nalazile postali su bazeni za uzgoj paraličinki. Za potrebe biometrijske analize i fotografiranja paraličinke su sedirane dodavanjem ohlađenog mora u petrijeve posude. Slikavanje paraličinki *Octopus vulgaris* je izvršeno pomoću Lupe: ZEISS Discovery, V12 Stereo nadograđen fotoaparatom ZEISS Axiocam ERc s izvorom hladnoga svjetla ZEISS CL 1500 HAL. Poduzorak izvaljenih paraličinki uzet je za genetsku analizu s ciljem testiranja informativnosti mikrosatelitnih biljega pri testu očinstva (populacija 19F1_P). Paraličinke su hranjene ranim razvojnim stadijima (zoa) raka žbirca (*Eriphia verrucosa*) prvih 30 dana života,

a kako bi imale konstantan dotok hrane u svakom bazenu s paraličinkama nalazila se jedna ženka žbirca s jajašcima (Slika 15). Prilikom značajnijeg pokretanja paraličinki, zabilježen je i kanibalizam. Sve paraličinke su puštene u more ispred Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. U istraživanju 2020. godine nije došlo do uspješne reprodukcije matičnog jata.



Slika 15. Ženka žbirca s jajašcima.

2.9. Prikupljanje jedinki za provjeru uspješnosti repopulacije

Prikupljanje jedinki provedeno je 5.12.2019. i 2.1.2020. u okolnom području ispuštenih paraličinki i u smjeru strujanja mora. Područje lova su bili Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, Vila Dalmacija, plaža Kaštelet, plaža Kašjuni, Katalinića brijeg, plaža Žnjan i rt otoka Čiovo. Sakupljene su 23 jedinke na kojim je odrađen test očinstva.

Tablica 3. Podatci o 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 Dalmacija; VD , plaža Kaštelet; Ka, plaža Kašjuni; K, Katalinića 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

Genomska DNA izolirana je pojednostavljenim postupkom za izolaciju DNA sisavaca (Laird i sur., 1991). Izolacija je izvršena iz manjeg dijela tkiva kraka i paraličinke. Postupku izolacije prethodio je korak ispiranja uzorka od alkohola destiliranom vodom. Izrezani dio uzorka ostavljen je na inkubaciji 3 sata u 300 μ l Lysis pufera (2 ml 1 M Tris-HCl, 4 ml 0,5 M EDTA, 6 ml 5M NaCl, 4 ml 10 % SDS i 184 ml H₂O) i 4 μ l proteinaze K u termomikseru na 55°C. Nakon inkubacije u lizirani uzorak je pažljivo dodan jednaki volumen fenol kloroforma, nakon čega je uzorak centrifugiran (13 000 K. 15 min). Nakon centrifugiranja gornja frakcija je otpipetirana u novu čistu tubicu i dodan je dvostruki volumen 96% alkohola te je potom ponovno centrifugiran sadržaj na 13 000 K/15 min. Nakon centrifugiranja odstranjen je etanol i precipitacija je ponovljena s 500 μ l 70%-tnog etanola. Uzorak je ostavljen na sušenju 30 minuta do sat vremena na sobnoj temperaturi nakon potpunog uklanjanja alkohola. Talog DNA je otopljen u 20-40 μ l TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), ovisno o njegovoj veličini. Izolati su ostavljeni preko noći na 4°C radi otapanja DNA. Količina i kvaliteta DNA ispitana je spektrofotometrijski, korištenjem uređaja Nanophotometer (Implen NanoPhotometer N50-Touch). Svaki uzorak je razrijeđen kako bi se dobila koncentracija DNA od 15 ng/ μ l. Uzorci su do daljnje obrade pohranjeni na – 20°C.

2.11. Genotipizacija mikrosatelitnih biljega

2.11.1. Izbor mikrosatelitnih biljega

Genetska karakterizacija svih uzoraka DNA *Octopus vulgaris* izvršena je pomoću dva multipleksa (Ovul1 & Ovul2), specifična za ciljanu vrstu, koji obuhvaćaju 6 mikrosatelitnih biljega opisanih od Greateorex i sur. (2000) i Zuo i sur. (2012) (Tablica 3). Kako bi se raspoznali isti veličinski fragmenti, korišteni su fluorescentno označeni početni nukleotidi, pri čemu su korištene plava (FAM), zelena (VIC) crna (NED) i crvena (PET) boja.

Tablica 4. Opis istraživanih mikrosatelitnih lokusa, fluorescentne boje i kombinacija početnica korištenih u dvije 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 R: ATCTCTAATCTTCATTGCGTCTAA	6-FAM	Di	365–377	24	Zuo i sur., 2012
	uOct4	AF197131	F: AGGGAGAGAAAATAGAAAAC R: TAAACTGAATAATACATACATACG	VIC	Di	160	22	Greatorex i sur., 2000
	Ovul17	JN579706	F: GCAGGGCGAACAGATGAC R: GCGTGCCTTTGGGTTCTC	NED	Di	350–362	11	Zuo i sur., 2012
Ovul2	Ovul08	JN579697	F: CCGTCAGATTATGCCAACAC R: GCGAGTGAAGGGGAAGTAGA	6-FAM	Di	307–335	6	Zuo i sur., 2012
	uOct8	AF197130	F: CTCCCTAGTTTTGAATCACG R: GCCACTAATACACTTTTCAAGG	NED	Di	147	31	Greatorex i sur., 2000
	uOv12	AF197135	F: GCATAATGTGCCGCTAAATGGAAC R: GCCTCGTCGGTATTTCTTTCA	PET	Tetra	269–341	17	Greatorex i sur., 2000

2.11.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

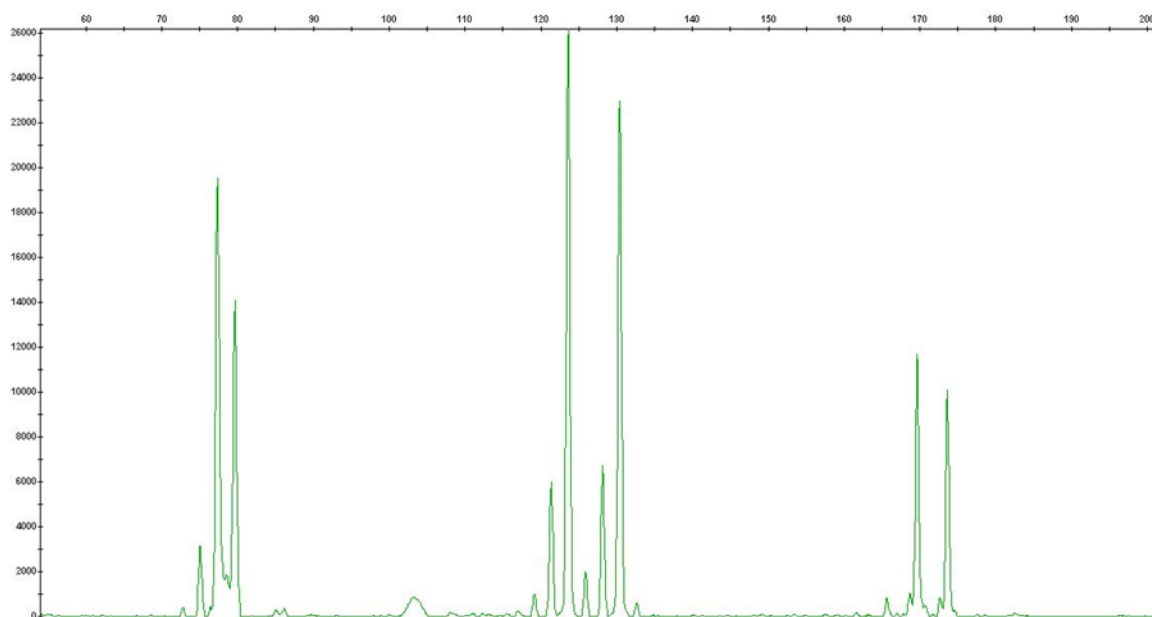
Izolirana DNA umnožena je primjenom biljega specifičnih za istraživanu vrstu lančanom reakcijom polimeraze (PCR), prema sljedećim koracima:

- 95°C/5 min (početna aktivacija polimeraze)
- 27 ciklusa 95°C/0.5min (denaturacija)
 57°C/1,5 min (spajanje lanaca)
 17 72°C/0,5 min (produljenje lanca)
- Konačno produljenje umnoženih sljedova DNA 60°C/30 min.

Tablica 5. Sastav PCR reakcijske smjese.

Sastavnice	Volumen/reakcija	Finalna koncentracija
Type-it Mix	5,5 µl	3 mM MgCl ₂
Primer Mix	1,1 µl	0,2 µM svake početnice
Voda oslobođena RNase	3,4 µl	–
DNA	1 µl	20 ng
Ukupni volumen reakcije	11 µl	

PCR reakcije provedena je u tubicama od 0,2 ml u uređaju Eppendorf Mastercycler nexus Gx2. Dobiveni PCR produkti poslani su u servis za sekvencioniranje MacroGen, koji koristi „ABI33730xl DNA Analyzer“, Applied Biosystems. Za očitavanje visine lokusa korišten je GeneMapper v. 3.5. (Applied Biosystems) (Slika 16).



Slika 16. Detektirani fragmenti lokusa u GeneMapper 4.0 softverskom paketu nakon elektroforeze u ABI Prism 33730 genetičkom analizatoru. (Izvor: Iva Žužul Vrgoč)

2.12. Statistička analiza podataka

Za unos i obradu podataka korišten je program Microsoft Excel. Njime su određeni prirast mase, specifična stopa rasta, apsolutna stopa rasta, apsolutna stopa ishrane, specifična stopa ishrane, efikasnost hranjenja, indeks konverzije hrane i ostali parametri.

2.12.1. Statistička analizi mikrosatelitnih podataka

Korištenjem programa Micro-Checker v.2.2.1 testirano je postojanje nul-alela (van Oosterhout i sur., 2004), a u slučaju značajnog rezultata procijenjena je učestalost ponavljanja unutar populacija. Za potrebe deskriptivne statistike uočena i očekivana heterozigotnost (H_O , H_E) analizirana je programskim paketom Arlequin (Excoffier i sur., 2005). Program POPGENE v. 1.32 (Yeh i sur., 2000) korišten je za izračun srednjeg broja alela po lokusu (A) i srednjeg efektivnog broj alela između lokusa (A_e), dok je program FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 2002) korišten se za izračun alelnog bogatstva (engl. *allelic richness*, A_r) te za izračun

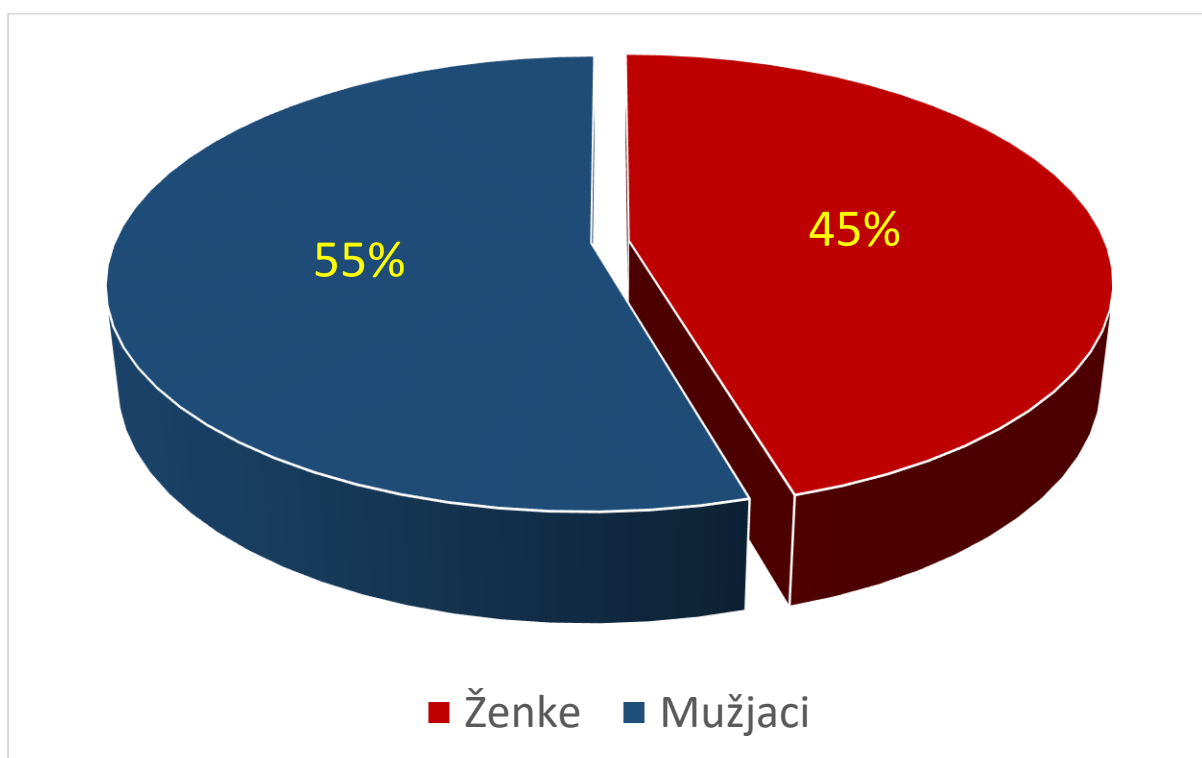
koeficijenta križanja u bliskom srodstvu odnosno fiksacijskog indeksa (FIS). Program NeEstimator V2 (Do i sur., 2014) korišten je za procjenu efektivne veličine populacije (NE).

Protok gena između populacija hobotnice određen je putem FST vrijednosti za ukupni set podataka i za sve parove populacija korištenjem programa Arlequin (Excoffier i sur., 2005). Analiza srodnosti provedena je pomoću programa CERVUS (Kalinowski i sur., 2007.) koji koristi metodu kategorične distribucije. Prvi korak je simulacija analize roditelja kojom se dobije granična vrijednost za vjerojatnost roditeljstva (LOD), a korištena je opcija za simulaciju potomstva kada su oba roditelja poznata.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1 Rezultati prikupljana matičnog jata

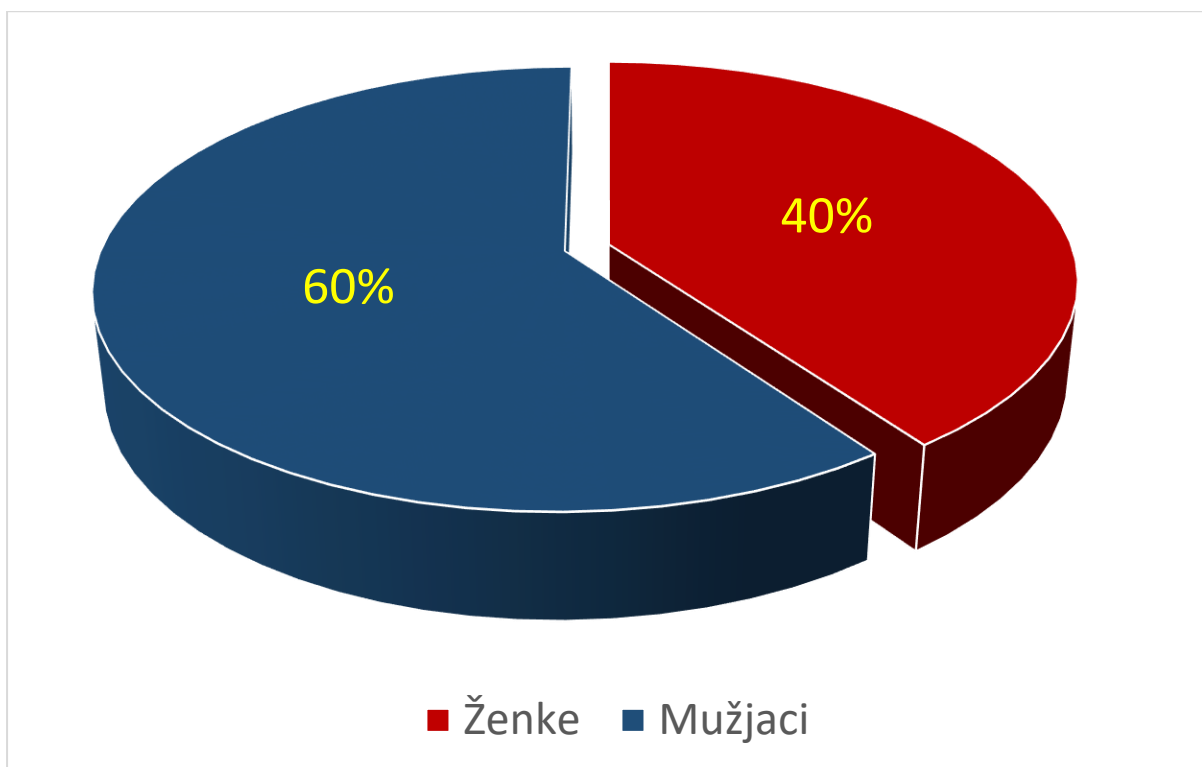
Tijekom siječnja 2019. godine za potrebe formiranja matičnog jata ulovljene su 22 žive hobotnice pomoću ribolovnog alata panula. Tijekom veljače 2020. godine prikupljeno je 15 hobotnica istom ribolovnom tehnikom. Korišteni alat panula bez udica i kuka koje se inače koriste za lov glavonožaca pozitivno je utjecao na preživljavanje prikupljenih jedinki. Nije zabilježen mortalitet niti mehaničko oštećenje prikupljenih jedinki. Hobotnice prikupljene u 2019. godini, 22 jedinke, su imale ukupnu masu od 9,11 kilograma i prosječnu masu od $413,95 \pm 176,84$ grama. Matični stok je sadržavao 12 mužjaka i 10 ženki (Slika 18).



Slika 18. Omjer spolova u matičnom jatu prikupljenom 2019. godine.

Sve ženke prikupljene u 2019. godini su imale ukupnu masu od 4,7 kilograma i prosječnu masu od $472,7 \pm 23713$ grama, dok su svi mužjaci prikupljeni u 2019. godini imali masu od 4,4 kilograma i prosječnu masu od $365 \pm 89,10$ grama.

Jedinke ulovljive 2020. godine, njih ukupno 15, imale su masu od 8,7 kilograma i prosječnu masu od $577 \pm 235,58$ grama. Omjer spolova u matičnom jatu je prevagnuo na stranu mužjaka s 9 primjeraka, u odnosu na 6 ženki (Slika 19).



Slika 19. Omjer spolova u matičnom jatu prikupljenom 2020. godine.

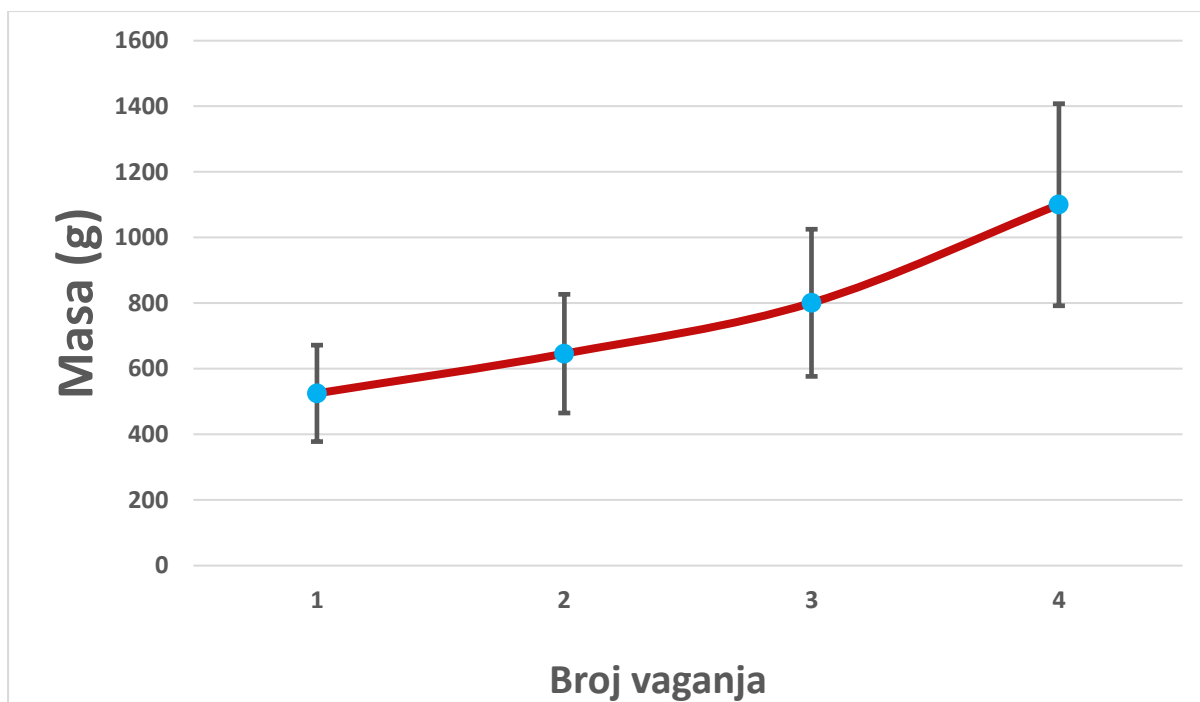
Sve ženke prikupljene u 2020. godini su imale ukupnu masu od 3,9 kilograma i prosječnu masu od $655 \pm 303,54$ grama, a svi mužjaci prikupljeni iste godine su imali masu od 4,7 kilograma i prosječnu masu od $525 \pm 178,169$ grama.

Tablica 6. Populacijske oznake *O. vulgaris* korištene u istraživanju (matično jata 2019. i 2020. godine, paraličinke iz matičnog jata 2019. godine i ponovno prikupljene jedinke za dokazivanje moguće repopulacije) (ženke; Z, mužjaci; M i neodređeni spol; X).

	N (uzorak)			Populacijska oznaka
	Z	M	X	
Spol				
Matično jato 2019.	10	12	/	19F0_Z, 19F0_M
Matično jato 2020.	6	9	/	20F0_Z, 20F0_M
Paraličinke	/	/	30	19F1_P
Odrasle jedinke - ulov	/	/	23	19F1_0

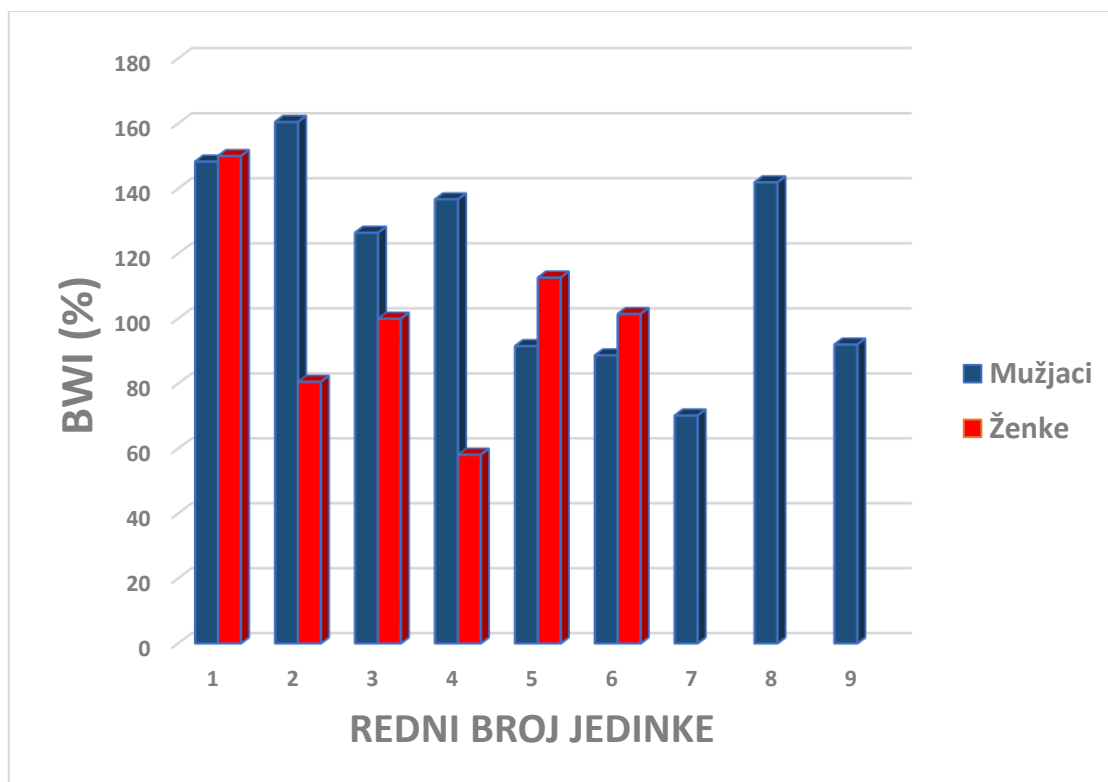
3.2 Rast hobotnice u kontroliranim uvjetima

Za potrebe istraživanja rasta matica hobotnica u kontroliranim uvjetima tijekom 2020. godine korištena su dva bazena volumena 12 m³. S obzirom na to da se željela izbjeći mogućnost slučajne kopulacije u jednom bazenu se nalazilo 9 mužjaka, a u drugom 6 ženki. Svaka jedinka je bila u zasebnom kavezu, hranjene su svaki dan, osim na dane vaganja i vikendima. Pokus koji je imao za cilj istražiti utjecaj hranjenja hobotnica u zatočeništvu na rast trajao je u razdoblju od 17.3.2020. godine do 12.5.2020. godine. Najmanja jedinka na početku istraživanja je imala masu od 310 grama, a najveća jedinka je imala masu od 1230 grama. Nakon šezdesetodnevnog hranjenja, ukupna masa jedinki je bila 17,39 kilograma, dok je prosječna masa bila 1159 ± 303,92 grama. Najmanja jedinka je na kraju istraživanja imala masu 750 grama, a najveća 1945 grama. U šezdesetodnevnom promatranom razdoblju ishrane nije zabilježen mortalitet (Slika 20).

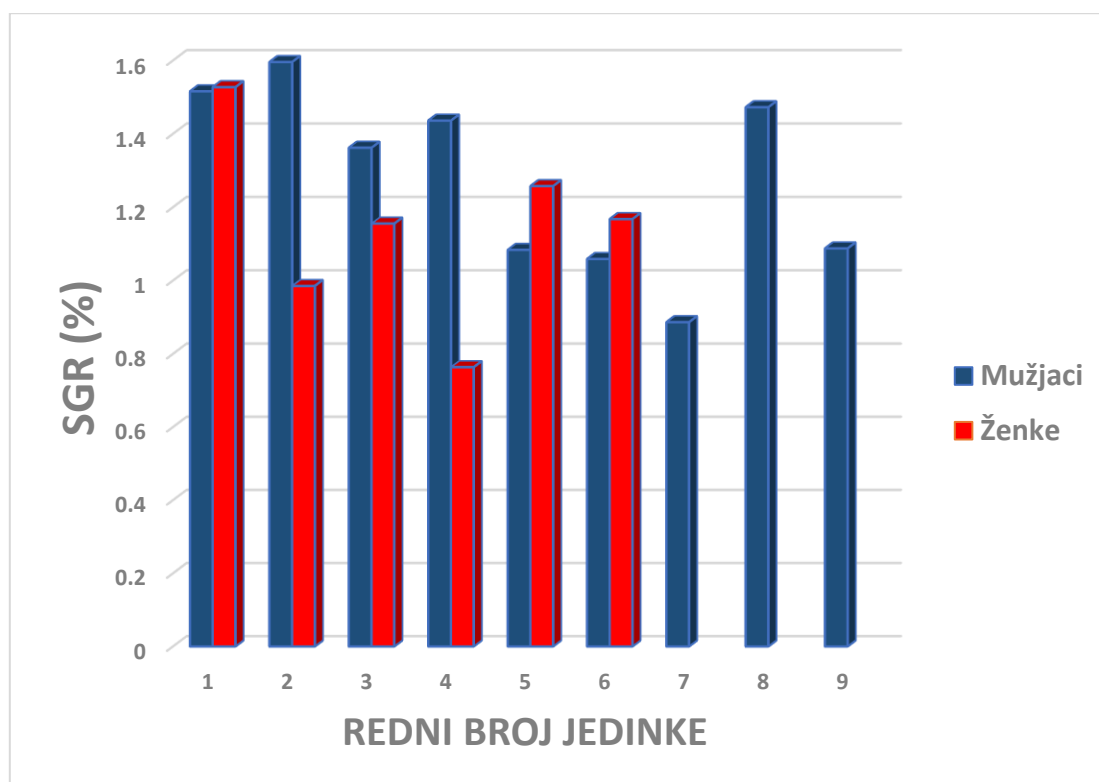


Slika 20. Vrijednost prosječne mase i standardne devijacije hobotnica u promatranom razdoblju od 60 dana.

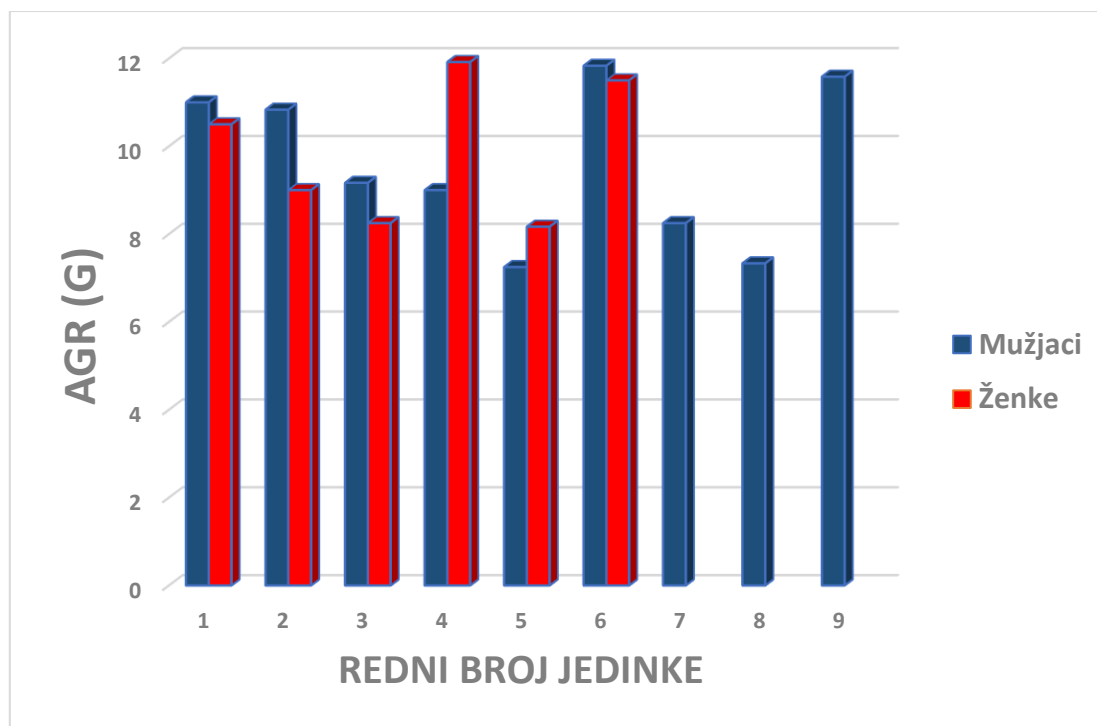
Tijekom predmetnog istraživanja najveći zabilježeni prirast mase (BWI) je iznosio 160,49%, dok je najniži BWI iznosio 58,13%. Rezultat prosječnog BWI tijekom uzgojnog razdoblja je iznosio $110,62 \pm 31,67\%$. Najviša specifična stopa rasta (SGR) iznosila je 1,59%, dok je najniža zabilježena vrijednost ovog parametra iznosila 0,76%. Tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja, prosječni SGR hobotnica iznosio je $1,22 \pm 0,25\%$, što pokazuje da su hobotnice za vrijeme ovog istraživanja svaki dan prosječno povećavale svoju masu za 1,22 %. Tijekom istraživanja, maksimalna apsolutna stopa rasta (AGR) iznosila je 11,91 grama, a minimalna AGR 7,25 grama. Prosječni zabilježeni AGR je $9,70 \pm 1,68$ grama, što pokazuje da je hobotnica svaki dan tijekom šezdesetodnevnog istraživanja povećavala svoju masu za 9,70 grama.



Slika 21. Ukupni prirast mase (BWI) hobotnice *O. vulgaris* tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja.



Slika 22. Ukupna specifična stopa rasta (SGR) hobotnice *O. vulgaris* tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja.

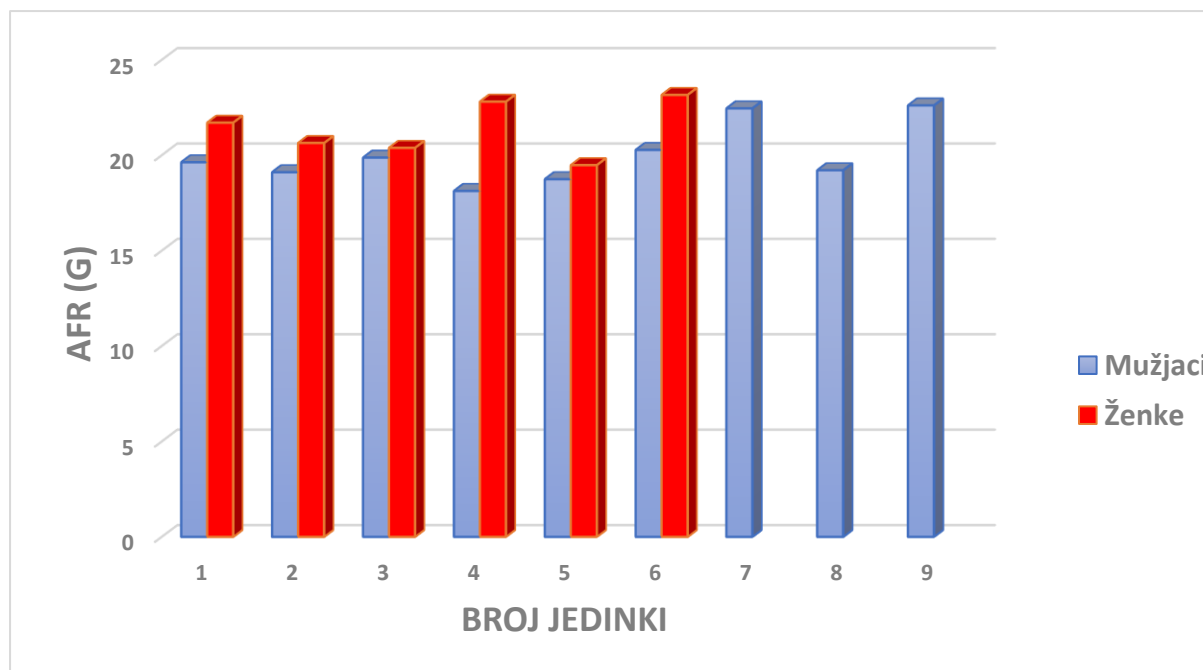


Slika 23. Ukupna apsolutna stopa rasta (AGR) hobotnice *O. vulgaris* tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja.

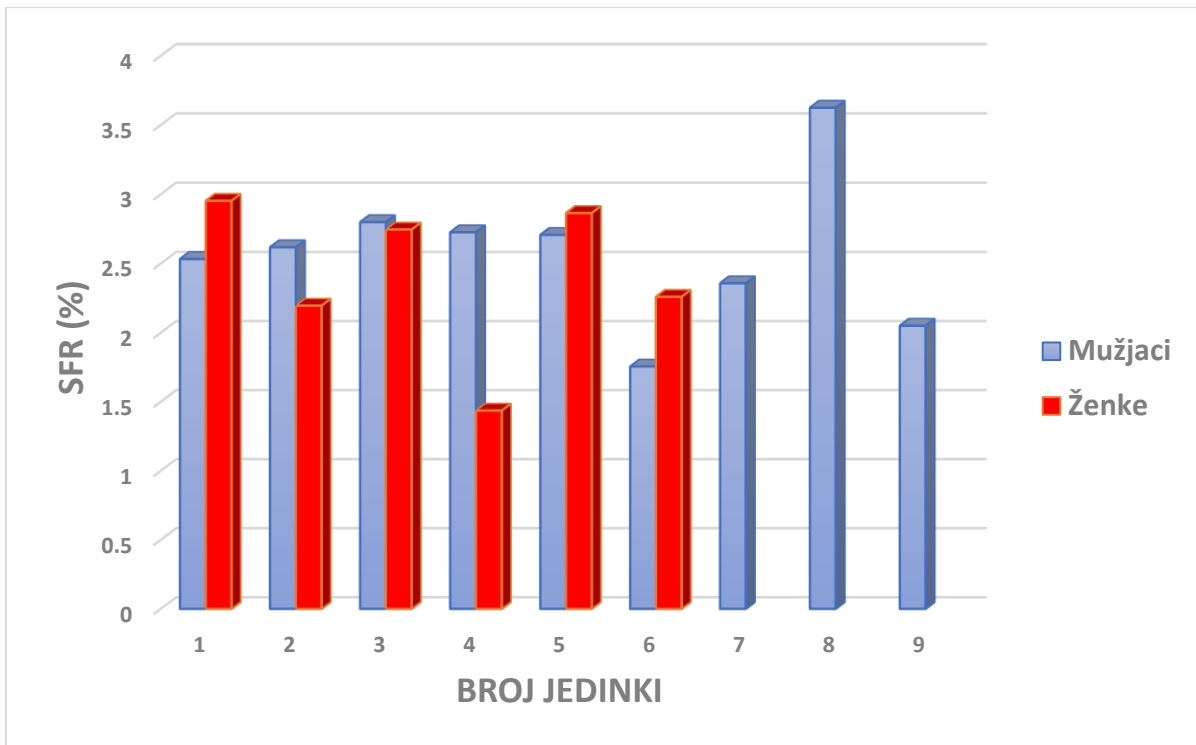
Korištenje raznih vrsta rakova u prehrani hobotnice podrazumijeva visoke troškove, što dovodi do povećanja cijena finalnog proizvoda. Međutim, alternativu rakovima predstavljaju male pelagične vrste riba. Vrste koje se koriste za hranjenje klasificiraju se kao plave ili bijele ribe, ovisno o biokemijskom sastavu tkiva, osobito sadržaju lipida. Vrsta kao što je srdela (*Sardina pilchardus*), masnija je od vrste poput bukve (*Boops boops*) što su utvrdili García i Giménez (2002) koji su zabilježili bolji specifični rast hobotnice (SGR) $0,78 \pm 0,12\%$ kod hranjenja s *B. boops* u odnosu na *S. pilchardus* kojom je postignut SGR $0,69 \pm 0,08\%$. Miješanje više vrsta riba u prehrani (*Sardina pilchardus*, *Boops boops* i *Trachurus trachurus*) rezultiralo je sa 1,91% SGR-a (Cagnetta, 2000). U istraživanju García i Valverde (2006) su za hobotnice hranjene *B. boops* zabilježili rezultate SGR $1,11 \pm 0,19\%$ i apsolutne stope rasta (AGR) $7,69 \pm 2,38$ grama. Slično je uočeno i u predmetnom istraživanju gdje je SGR na kraju pokusa iznosio $1,22 \pm 0,25\%$, a AGR je iznosio $9,70 \pm 1,68$ grama. Slične rezultate dobio je i Petrić (2013) koji je u svom istraživanju koristio uglavnom ishranu baziranu na vrsti *S. pilchardus*, gdje je SGR iznosio $0,94 \pm 0,19\%$ i AGR $5,44 \pm 1,63$ grama.

3.3 Ishrana hobotnica u kontroliranim uvjetima

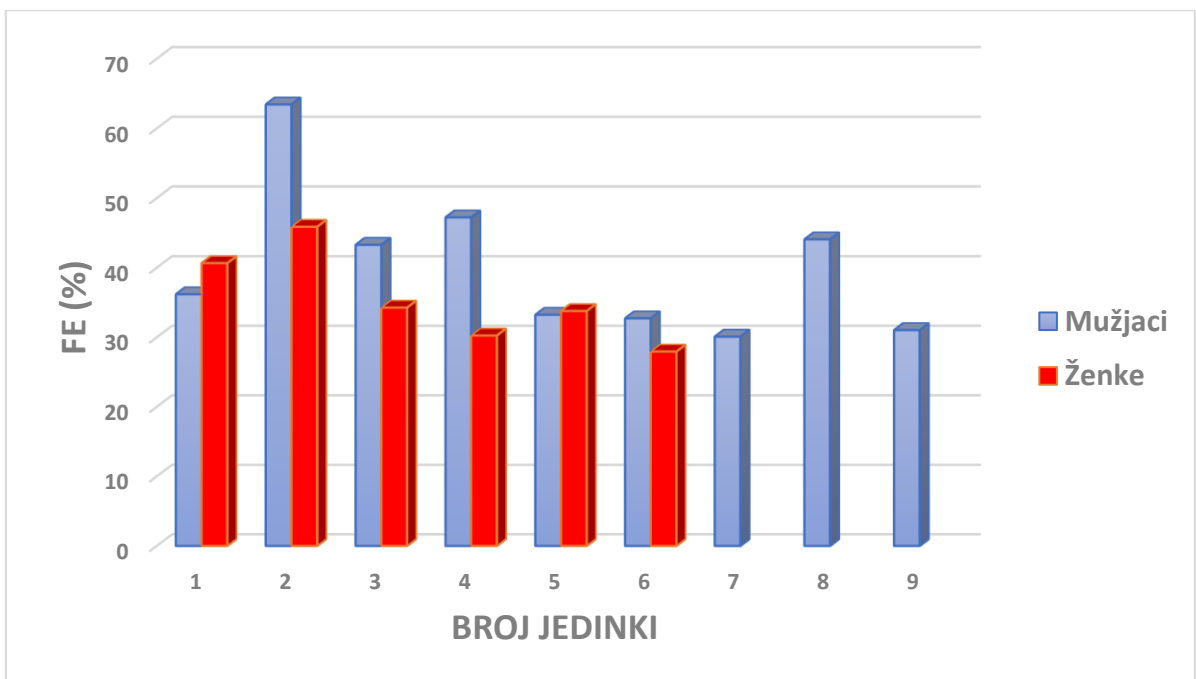
Tijekom istraživanja zabilježena je maksimalna apsolutna stopa ishrane (AFR) koja je iznosila 23,16 grama, dok je minimalna vrijednost ovoga parametra bila 18,12 grama. Prosječni AFR iznosio je $20,54 \pm 1,61$ grama, što pokazuje da su hobotnice za vrijeme istraživanja svaki dan u prosjeku konzumirale 20,54 grama (*S. pilchardus* ili *E. encrasicolus*). Maksimalna specifična stopa ishrane (SFR) iznosila je 3,62 %, a minimalna 1,44%, dok je prosječni SFR iznosio $2,51 \pm 0,53\%$. Prosječna efikasnost hranjenja (FE) u istraživanju provedenom 2020. godine iznosila je $38,28 \pm 9,34\%$, maksimalni FE 63,44%, a minimalni 27,96%. Rezultati FE nam pokazuju da su hobotnice za vrijeme ovog eksperimenta prosječno iskoristavale 38,28% od ukupne mase probavljene hrane. Tijekom ovog istraživanja, prosječni indeks konverzije hrane (FCR) iznosio je $3,70 \pm 0,65\%$. Minimalni zabilježeni FCR je iznosio 2,92 %, a maksimalni FCR 4,79%. Na kraju istraživanja, finalna prosječna masa utrošene hrane (*S. pilchardus* ili *E. encrasicolus*) po uzgojenoj hobotnici iznosila je $2082 \pm 9,11$ grama.



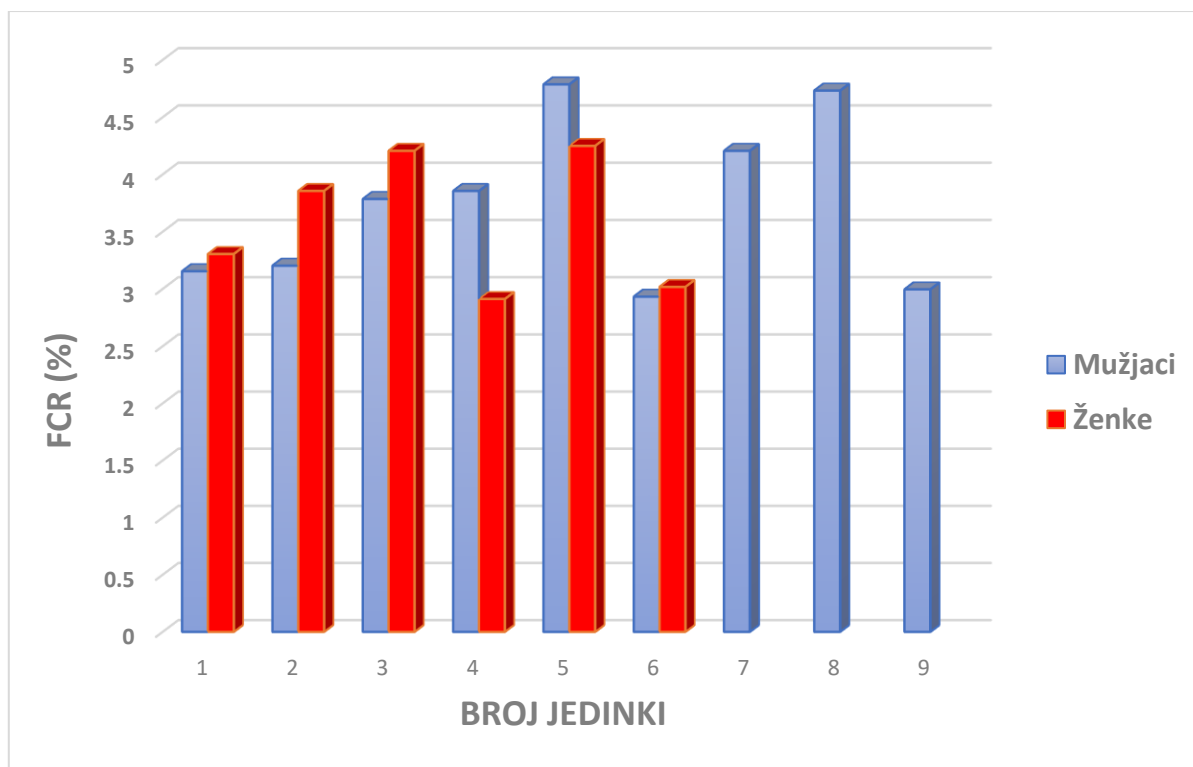
Slika 24. Ukupna apsolutna stopa ishrane (AFR) hobotnice *O. vulgaris* tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja.



Slika 25. Ukupna specifična stope ishrane (SFR) hobotnice *O. vulgaris* tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja.



Slika 26. Ukupna efikasnost hranjenja (FE) hobotnice *O. vulgaris* tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja.



Slika 27. Ukupni indeks konverzije hrane (FCR) hobotnice *O. vulgaris* tijekom šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja.

Premda su García i Giménez (2002) utvrdili bolji specifični rast (SGR) kod prehrane s *B. boops*, u odnosu na *S. pilchardus*, bolje rezultate specifična stopa ishrane (SFR) je imala korištenjem *S. pilchardus* $1,675 \pm 0,17\%$ u odnosu na *B. boops* $2,055 \pm 0,27\%$. Istraživanja prehrane kod glavonožaca započela su 90-ih godina dvadesetog stoljeća no do danas nisu postignuti zadovoljavajući rezultati za bilo koju vrstu glavonožaca (Domingues i sur., 2007). Petrić (2013) je u svom istraživanju s ishranom baziranom na *S. pilchardus* (73%), dobio rezultate gdje je apsolutna stopa ishrane (AFR) iznosila $62,55 \pm 12,56$ grama, specifična stopa ishrane (SFR) $11,07 \pm 2,22\%$, efikasnost hranjenja (FE) $8,64 \pm 1,47\%$ i indeks konverzije hrane (FCR) $11,94 \pm 2,99\%$. Suprotno rezultatima ovog istraživanja, rezultati predmetnog istraživanja bili su znatno niži, gdje je AFR iznosio $20,54 \pm 1,61$ grama, SFR $2,51 \pm 0,53\%$, FE $38,28 \pm 9,34\%$ i rezultati FCR su iznosili $3,70 \pm 0,65\%$. Naime, potrebno je naglasiti da se nutritivne potrebe nužne za uspješan rast i razvoj mijenjaju ovisno o raznim čimbenicima poput naglih promjena temperature, režima hranjenja ili individualnog podnošenja stresa uzrokovanih zatočeništvom. Međutim García i Valverde (2006) su u svom istraživanju za hobotnice hranjene *B. boops* zabilježili rezultate gdje je AFR iznosio $18,88 \pm 5,79$ grama, SFR $2,63 \pm 0,40\%$, FE $40,76 \pm 2,57\%$ i FCR $2,46 \pm 0,16\%$, što je usporedivo s rezultatima

dobivenim u ovom istraživanju. Stoga, usporedbe literaturnih navoda koji opisuju parametre iskoristivosti hrane kod uzgoja hobotnica s onima korištenim u predmetnom istraživanju treba uzeti s određenom rezervom.

3.4 Fekunditet

Tijekom istraživanja 2019. godine od ukupno 10 ženki, 3 su ženke imale pozitivnu oplodnju. Svaka ženka se nalazila u zasebnom bazenu. Prosječna masa ženki za vrijeme oplodnje iznosila je $981,67 \pm 84,61$ grama, dok je prosječna masa mokrih jaja iznosila $379,67 \pm 27,54$ grama. 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, dok je duljina plašta paraličinki 10 dana nakon izvaljivanja iznosila je $2,48 \pm 0,13$ mm.

Tablica 7. Karakteristike i biometrijski podaci o razmnožavanju hobotnice tijekom istraživanja 2019. godine.

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

Iglesias i sur. (2000) su u svom istraživanju, koje je provedeno na 20 odraslih ženki, zabilježili rezultate u kojima je ukupni broj izlegnutih jaja iznosio $328,500 \pm 214,228$. Duljina jaja na početku embrionalnog razdoblja je bila $2,51 \pm 0,05$ mm, dok je duljina plašta paraličinki iznosila $2,95 \pm 0,19$ mm. Kivengea i sur. (2014) su zabilježili slične rezultate gdje je prosječni fekunditet iznosio $154,057 \pm 29,131$, a duljina jaja $2,8 \pm 0,4$ mm. Oba navedena istraživanja su u skladu s dobivenim rezultatima predmetnog istraživanja, štoviše rezultati predmetnog istraživanja prikazuju blago povećane duljine tek izlegnutih jaja.

3.5 Genetska raznolikost hobotnice (*Octopus vulgaris*) i analiza srodnosti

Višelokusna genotipizacija izvršena je na svim prikupljenim jedinkama matičnog jata (19F0_M, 19F0_Z, 20F0_M i 20F0_Z), paraličinkama (19F1_P) i potencijalnim potomcima matičnog jata (19F1_O) uz primjenu začenica specifičnih za predmetnu vrstu (Tablica 1 i Tablica 3).

Srednja očekivana heterozigotnost (H_e) bila je veća od 60 % za svih 6 populacija s rasponom od 0,66 (populacija 19F1_P) do 0,83 (populacija 19F0_M) dok je srednja zapažena heterozigotnost (H_o) bila u rasponu od 0,53 (populacija 19F0_M) do 0,82 (populacija 20F0_M i 19F1_O) (Tablica 8.).

Srednji broj alela po lokusu (A) se kretao od 6,2, (populacija 20F0_Z) do 13,2 (populacija 19F1_O). Najvarijabilniji je bio lokus uOct8 s rasponom broja alela od 7 (populacija 20F0_Z) do 23. Efektivni broj alela po lokusu (A_e) je bio u rasponu od 4,6 (populacija 19F1_P) do 6,2 (populacija 19F0_M). Alelna bogatstvo (A_r), koje je mjera broja alela nezavisnih od veličine uzorka, kretalo se u rasponu od 4,6 (populacija 19F1_P) do 6,2 (19F0_M, i 19f1_O). Broj privatnih alela (A_{pr}) je bio od 3 (populacije: 19F0_M, 19F0_Z i 20F0_Z) do 13 (19F1_O). Koeficijent križanja u bliskom srodstvu, odnosno fiksacijski indeks FIS, bio je u rasponu od 0,01 (populacija 19F0_M) do 0,110 (populacija 20F0_Z). Efektivna veličina populacije, N_e , (engl. *effective population size*), koja predstavlja broj reproduktivno sposobnih jedinki u idealnoj populaciji najveća je bila za populaciju 19F1_O (205).

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	

Potpuni prikaz FST vrijednosti između parova populacija (*Octopus vulgaris*) seta podataka prikazan je u Tablici 9.

Tablica 9. FST vrijednosti između parova populacija hobotnice (*Octopus vulgaris*). Značajne FST vrijednosti su podcrtane. Kratice populacija su objašnjene u Tablici 6.

	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>

Statistički značajne FST vrijednosti nađene su u 5 od 15 usporedbe parova (nakon Bonferroni korekcije).

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

Nakon analize granične vrijednosti LOD za istraživane populacije (Tablica 9.) u programu CERVUS, analizirane su majke, očevi te par roditelja za 30 paraličinki (populacija 19F1_P) i 23 jedinke koje su potencijalni potomci matičnog jata (populacija 19F1_O).

Prepoznato je za 9 paraličinki roditeljski par s visokom razinom pouzdanosti, a kod ulovljenih potencijalnih potomaka matičnog jata prepoznata su dva para roditelja za jedinke 19F1_O_09 i 19F1_O_12. Kao par roditelja prepoznate su jedinke 19F06 i 19M10.

4. ZAKLJUČCI

Na temelju zootehničkih parametra i korištenja mikrosatelitnih biljega u istraživanju o mogućnosti prikupljanja i održavanja matičnog jata hobotnica koje se temelji na ribolovu nedoraslih jedinki i njihovom uzgoju u zatočeništvu, kao i procijeni mogućnost održavanja matičnog jata hobotnice i repopulacija ove vrste provedenom 2019. godine i 2020. godine doneseni su sljedeći zaključci.

1. Tradicionalni alat panula jednostavne konstrukcije koji se sastojao od motovila na kojem se nalazila monofilamentna struna, polučio je odlične rezultate u ulovima živih jedinki vrste *O. vulgaris* namijenjenih daljnjem uzgoju. Imobiliziranje za vrijeme transporta u zasebnim mrežnim sakama i redovita izmjena mora u transportnom bazenu, pokazali su se kao odlična metoda u transportu živih jedinki.

2. Pod uvjetom da se ulov i transport obave uz minimalni stres za jedinke, daljnje preživljavanje *O. vulgaris* je na visokoj razini. Mortalitet za vrijeme ulova i transporta nije zabilježen, dok je period prilagodbe na uvjete zatočeništva jako kratak, svega nekoliko sati.

3. Rezultati šezdesetodnevnog uzgojnog razdoblja predstavljaju vrstu *O. vulgaris* kao pogodnog kandidata za uzgoj ili za potrebe repopulacije. Održavanje matičnog jata se provelo u zatvorenom tipu bazena što je spriječilo mortalitet zbog kanibalizma. Prehrana se bazirala isključivo na sitnoj pelagičkoj ribi, a rezultati su opisani zootehničkim 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 procjene 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) $3,70 \pm 0,65\%$.

5. Jedna od najvažnijih poželjnih karakteristika hobotnica u zatočeništvu je reprodukcija. U brojnim istraživanjima potvrđeno je da hobotnice u zatočeništvu mogu imati uspješnost reprodukcije veću od 90%. Međutim, u istraživanju 2019. godine samo 3 ženke su imale

uspješnu reprodukciju, što je 30% uspješnosti. U istraživanju 2020. godine nije zabilježena uspješna reprodukcija.

6. 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 duljina plašta paraličinki $2,48 \pm 0,13$ mm. Prvih 30 dana, matični stok jata paraličinki se hranio ranim razvojnim stadijima (zoa) raka žbirca *E. verrucosa*. Kanibalizam nije zabilježen sve dok nije primijećeno značajnije pokretanje paraličinki.

7. Test srodnosti kod 30 paraličinki (populacija 19F1_P) rezultirao je s 9 prepoznatih paraličinki za roditeljski par (19F06 i 19M10) s visokom razinom pouzdanosti, a primjena 6 neutralnih mikrosatelitnih biljega omogućila je identifikaciju dva potomka iz jata uzorkovanih jedinki na kojima je odrađena analiza srodnosti. Dva identificirana potomka su povezana sa specifičnim jedinkama (19F1_O_09 i 19F1_0_12) iz matičnog jata hobotnica. Stoga, ovi rezultati upućuju na potencijalnu mogućnost repopulacije hobotnice, 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 mriješta i rasta *O. vulgaris* i genetske raznolikosti populacija pružaju dodatne informacije nužne za proces upravljanja resursima, za mogućnosti uspješne repopulacije kao i za povećanje reproduktivne uspješnosti. Za potencijalno obnavljanje ili povećanje matičnog jata, potrebno je uložiti dodatne napore kako bi se riješili problemi kao što su biološka raznolikost, socijalna i ekonomska svjesnost i održivost.

4. LITERATURA

- Bell JD, Rothlisberg PC, Munro J.L, Loneragan NR, Nash WJ, Ward RD, Andrew NL. 2005. Restocking and stock enhancement of marine invertebrate fisheries. *Adv Marine Biology*, 49: 1–370.
- Blankenship HL, Leber KM. 1995. A responsible approach to marine stock enhancement. *Am Fish Soc Symp*, 15: 167–175.
- Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, 1983 E. Boucaud-Camou and R. Boucher-Rodoni, Feeding and digestion in *cephalopods*. In: A.S.M. Wilbur, Editor, *The Mollusca, Physiology*, Part 2 vol. 5, Academic Press, 189 str.
- Boletzky SV. 1987. Embryonic phase. In: P.R. Boyle, Editor, *Cephalopod Life Cycles, Comparative Reviews* vol. II, Academic Press, str. 23–25.
- Boyle P, Rodhouse P. 2006. *Cephalopods: Ecology and Fisheries*, 2 nd. ed. Blackwell Publishing, 439 str.
- Budelmann BU. 1996. Active marine predators: The sensory world of *cephalopods*. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*, 27:2-3.
- Cagnetta P, Sublimi A. 2000. Productive performance of the common octopus (*Octopus vulgaris* C) when fed on monodiet. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification Zaragoza : CIHEAM-IAMZ, 394 str. (Cahiers Options Méditerranéennes ; v. 47), str. 331-336.
- 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. *Sci Rep* 10, 15261. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72151-y>
- Cinoti N. 2007. Mrijest i uzgoj najranijih stadija hobotnice (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797.), u kontroliranim uvjetima, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Sveučilišni studijski centar za studije mora, Split, 271, str.
- Devin M Bartley, Johann D Bell. 2008. Restocking, Stock Enhancement, and Sea Ranching: Arenas of Progress, *Reviews in Fisheries Science*, 16:1-3, 357-365, DOI: 10.1080/10641260701678058
- Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillett BJ, Ovenden JR. 2014. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Mol Ecol Resour*, 14: 209-214.

- Domingues P, Lo'pez N, Mun'oz J, Maldonado T, Gaxiola G, Rosas C. 2007. Effects of an artificial diet on growth and survival of the Yucata'n octopus, *Octopus maya*. *Aquac Nutr*, 13:273–280
- Excoffier L, Lischer HE. 2010. Arlequin suite, version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- FAO, 2011-2014. Fisheries and Aquaculture software Fishstat J - Software for fishery statistical time series. Dostupno na <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>, pristupljeno: prosinac, 2020.
- Fonseca T, Campos A, Afonso-Dias M, Fonseca P, Pereira J. 2008. Trawling for *Cephalopods* off the Portuguese coast-fleet dynamics and landings composition. *Fish Res* 92: 180–188.
- Franetović I. 2002. Čeljusti Jadranskih glavonožaca (*Cephalopoda*) u određivanju njihove vrste i veličine. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 23 str.
- García B, Valverde J. 2006. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) ongrowing. *Aquaculture*, 253: 502-511.
- Garcia invalidator Benjamin, Aguado-Giménez Felipe. 2002. Influence of diet on growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture*, 211 :171-182.
- Galarza JA, Turner GF, Macpherson E, Carreras-Carbonell J, Rico C. 2007. Crossamplification of 10 new isolated polymorphic microsatellite loci for red mullet (*Mullus barbatus*) in striped red mullet (*Mullus surmuletus*). *Molecular Ecology*, 7 (2): 230-232.
- Goudet J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2) <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Hamasaki K, Kitada S. 2006. A review of kumura prawn *Penaeus japonicus* stock enhancement in Japan *Fish Resource*, 80: 8–90.
- Hoshino AA, Bravo JP, Morelli KA, Nobile M. 2012. *Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis*. INTECH Open Access Publisher.
- Iva ŽV. 2020. Genetska varijabilnost i struktura populacije komarče *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) u istočnom Jadranu. Doktorska disertacija, Sveučilište u Splitu, 123 str.
- Iglesias J, Sánchez FJ, Otero JJ, Moxica C. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): Present knowledge, problems and perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47: 313-321.

- Iglesias J, Otero JJ, Moxica C, Fuentes L, Sánchez FJ. 2004. The Completed Life Cycle of the Octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under Culture Conditions: Paralarval Rearing using Artemia and Zoeae, and First Data on Juvenile Growth up to 8 Months of Age Aquaculture International, 4-5: 481-487.
- Iglesias J, Lidia F, Villanueva R. 2014. *Cephalopod* Culture. 10.1007/978-94-017-8648-5_23, 507 str.
- Jereb P, Proper CFE, Norman MD, Finn JK. 2014. *Cephalopods* of the world. An annotated and illustrated catalogue of *cephalopod* species known to date. Volume 3. *Octopods* and Vampire squids. FAO Species Catalogue for fisheries Purposes. N° 4 Vol. 3 Rome, FAO, 649 str.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, & T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment Molecular Ecology, 16: 1099-1106.
- Kivengea GM , Ntiba MJ, Sigana DO, Muthumbi AW. 2014. Reproductive Biology of the Common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) in South Kenya. Western Indian Ocean J. Marine Science Vol. 13. No. 1, str. 47 – 56.
- Kolkovski S, King J, Watts N, Natale M, Mori A, Cammilleri R, Cammilleri C. 2009. Development of octopus aquaculture Final Report. FRDC Project No. 2009/206. Fisheries Research Report No. 262. Department of Fisheries, Western Australia, 144 str.
- Kröger B, Vinther J, Fuchs D. 2011. *Cephalopod* origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development and molecules: Extant *cephalopods* are younger than previously realised and were under major selection to become agile, shell-less predators. BioEssays, 33: 602–613.
- Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucleic Acid Research, Vol. 19, No:15.
- Mangold K. 1983. *Octopus vulgaris*. In *Cephalopod* life cycles, vol. I, species accounts (P. R. Boyle, ed.), str. 335-364.
- Mangold K, Boletzky SV. 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. Marine Biology, 19:7-12.
- Mather JA. 1994. ‘Home’ choice and modification by juvenile *Octopus vulgaris*, (*Mollusca: Cephalopoda*): specialized intelligence and tool use?, J. Zool. (Lond.), str. 359–368.

- Mather JA, O'Dor RK. 1991. Foraging strategies and predation risk shape the natural history of juvenile *Octopus vulgaris*. *Bulletin of Marine Science*, 49: 256–269.
- Matoničkin I, Habdija I, Primc-Habdija B. 1998. Beskralježnjaci – biologija nižih avvertebrata, ŠK Zagreb, 691 str.
- Nixon M, Young JZ. 2003. *The Brains and Lives of Cephalopods*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Petrić J. 2013. Uzgoj hobotnice (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), u kontroliranim uvjetima, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora, 46 str.
- Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science*, 1: 215-222.
- Pierce GJ, Allcock L, Bruno I, Bustamente P, Gonzalez A, Guerra A, Jereb P, i sur. 2010. *Cephalopod* biology and fisheries in Europe. ICES Cooperative Research Report, 303, 175 str.
- Roper CFE, Voss GL. 1983. Guidelines for taxonomic descriptions of *cephalopod* species. In: *Memoirs of the National Museum of Victoria* Stone DM, 44 :49-63.
- Rocha F, Guerra A, Prego R, Piatkowski U. 1999. *Cephalopod* paralarvae and upwelling conditions of Galician waters (NW Spain), *Journal of Plankton Research*, vol. 21, no. 1, str. 21-33.
- Ricker WE. 1979. Growth rates and models. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. & Brett, J.R. (eds), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, 677-743 str.
- Selkoe KA, Toonen RJ. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629.
- Sparre P, Venema CS. 1998. *Introduction to Tropical Fish Stock Assessment – Part 1: Manual*, FAO. Fish.Tech. Pap. 306/1 Rev., 2: 47-114.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Willis DPM, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 4: 535-538.
- Villanueva R. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52 : str. 2639-2650.
- Wang Q, Zhuang Z, Deng J, Ye Y. 2006a. Stock enhancement and translocation of the shrimp *Penaeus chinensis* in China. *Fish Resources*, 80: 67–79.

- Yeh F, Young R, Boyle T. 2000. POPGENE, Version 1.32. A Microsoft Windows –Based Freeware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada. Dostupno na: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/info.htm>, pristupljeno: pristupljeno prosinac, 2020.
- Young RE, Harman RF. 1988. “Larva”, “paralarva” and “subadult” in cephalopod terminology, *Malacologia* 29 (1), str. 201–207.