

L'ALLEVAMENTO E MANAGEMENT DEI CEFALOPODI E LORO UTILIZZO NELLA RICERCA SCIENTIFICA

ANNA DI COSMO, GIANLUCA POLESE, VALERIA MASELLI

dicosmo@unina.it

*Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli
Task Force Blue Italian Growth BIG FED II – MARE*

I CEFALOPODI

I cefalopodi sono la classe di molluschi più complessa e meno rappresentata, in termini di numero di specie (Hanlon and Messenger 1996). Con i loro grandi occhi e il loro comportamento “intelligente”, affascinano da sempre l'umanità fin dalle antiche culture minoica, greca e cinese attirando l'attenzione non solo degli scienziati. Includono esclusivamente animali marini che hanno colonizzato sia le acque superficiali che quelle profonde, occupando una vasta gamma di nicchie ecologiche. Vivono in tutti gli oceani del mondo, ad eccezione del Mar Nero e del Mar Caspio. Sono stati tra i grandi predatori che hanno dominato gli oceani durante la loro lunga storia geologica. Si sono evoluti durante l'era Cambriana, popolarono i mari prima dei pesci, divenendo predatori dominanti e a loro volta preda di altri grandi predatori, con un ruolo importante nelle reti trofiche degli ecosistemi marini (Jereb and Roper 2005; Pierce et al. 2008). Rappresentano a tutt'oggi un importante fonte di cibo per molte specie marine e per l'uomo. Nel corso degli ultimi 60 anni negli oceani e mari del mondo il numero di cefalopodi è aumentato (Doubleday et al. 2016). Attualmente si ritiene che i cambiamenti su vasta scala dell'ambiente marino, causati dalle attività umane, quali il riscaldamento globale e la pesca eccessiva delle specie ittiche (predatrici e competitori dei cefalopodi), rappresentino il driver dell'aumento globale dei cefalopodi.

Gli scienziati sono stati sempre attratti dalle capacità esibite da alcuni cefalopodi (polpi, seppie e calamari), che consentono loro di fare cose che non ci si aspetterebbe da un mollusco: apprendono (Grasso and Basil 2009; Hochner et al. 2006), memorizzano e

mostrano comportamenti sofisticati in natura quando mettono in atto strategie di predazione, difesa e riproduzione (De Lisa et al. 2012; De Lisa et al. 2013; Hanlon and Messenger 1996; Hvorecny et al. 2007). Inoltre dormono (Frank et al. 2012), mostrano una sorta di “personalità” (Godfrey-Smith 2016; Mather 2008; Pronk et al. 2010) e sono in grado di utilizzare strumenti (Huffard 2013). I polpi, in particolare, sono abili nel cambiare il loro comportamento per adattarsi a diverse circostanze (Norman et al. 2001). Questo tipo di comportamento adattativo suggerisce che questi animali possiedono coscienza e capacità di percepire il dolore, una proprietà che gioca un ruolo fondamentale nel modellare il loro comportamento in natura (Crook and Walters 2011; Vitti 2013; Winlow et al. 2018). Questa loro grande capacità adattativa potrebbe essere collegata ad un'altra intrigante caratteristica scoperta recentemente grazie al sequenziamento del genoma e del trascrittoma di *Octopus bimaculoides*: la capacità di modificare alcuni geni, cambiando l'RNA che codifica per le proteine (Albertin et al. 2015; Liscovitch-Brauer et al. 2017). Convenzionalmente si ritiene che l'RNA agisca come un messaggero intermedio, tra il DNA e le proteine, ma può accadere che l'RNA modificato, cambiando le proprie istruzioni genetiche, crei proteine che non sono originariamente codificate nel DNA, permettendo ad un organismo di aggiungere nuove proteine al suo modello genetico di base; questo meccanismo è definito *RNA-editing*. I coleoidi hanno decine di migliaia di cosiddetti siti di ricodifica dell'RNA, quindi più del 60% delle trascrizioni di RNA viene ricodificato mediante *editing*, un valore incredibilmente più alto di quello osservato in altri animali, tra cui i moscerini della frutta e

l'uomo, nei quali si raggiunge al massimo un valore dell'1%. Tali recenti scoperte hanno consentito la realizzazione di calamari (*Euprymna scolopes*) transgenici mediante la tecnica CRISPR-Cas9 (Rosenthal *personal communication*), dando la possibilità di creare modelli traslazionali di malattie.

Una delle caratteristiche più affascinanti dei cefalopodi è la loro capacità di mimetizzarsi cambiando il colore della loro pelle in pochi secondi per adattarsi all'ambiente circostante e sparire completamente sullo sfondo. I cefalopodi in un paio di secondi fanno quello che gli scienziati delle "machine learning" e di "computer vision" riescono ad ottenere solo dopo aver addestrato reti neurali a riprodurre un ambiente. Questa capacità è dovuta ai cromatofori, iridofori, leucofori e cellule riflettenti contenuti nella loro pelle multistrato (Buresch et al. 2015; Grasso and Basil 2009; Packard 1972). Questi organi sono di diversi colori, a seconda del pigmento che contengono e di diverse dimensioni. Sono controllati da motoneuroni per gruppi di cromatofori dello stesso colore in modo gerarchico (Reiter et al. 2018). Se l'animale vuole sparire in uno sfondo scuro, i cromatofori neri devono espandersi mentre quelli gialli devono ridursi. Quindi i motoneuroni "a controllo nero" invieranno il messaggio di contrazione dei muscoli, mentre i motoneuroni "a controllo giallo" rimarranno in silenzio. Il camouflage è una caratteristica di immensa complessità e, nonostante le molte decadi di indagini, siamo solo all'inizio della nostra comprensione dei meccanismi che regolano la percezione visuale-spaziale dei cefalopodi e l'adattamento all'ambiente circostante. Recenti indagini hanno iniziato a rivelare l'esistenza di meccanismi indipendenti di controllo del camouflage basati esclusivamente sulla "percezione della pelle" dell'illuminazione ambientale (Kingston et al. 2015; Ramirez and Oakley 2015). Questi studi hanno dimostrato che i cromatofori, possono essere attivati dalla luce in un modo completamente indipendente dal sistema nervoso centrale. Questo processo è basato su un meccanismo molecolare co-

mune e conservato di foto-trasduzione della luce che avviene tra l'occhio e la pelle.

L'attenzione a queste affascinanti abilità si è sviluppata in oltre 100 anni di ricerca classica dedicata allo studio degli aspetti sia comportamentali che neurofisiologici di questi "invertebrati avanzati" (Hochner et al. 2006). La neuroetologia, che combina neuroscienza ed etologia, mira ad esplicitare le basi neurofisiologiche che sottendono al comportamento animale ed è il campo in cui maggiormente si sono sviluppate le ricerche sui cefalopodi (De Lisa et al. 2012; De Lisa et al. 2013), in particolare su Calamaro (*Loligo vulgaris*), Seppia (*Sepia officinalis*) e Polpo (*Octopus vulgaris*).

Dal 1° gennaio 2013, le circa 700 specie di cefalopodi viventi sono state incluse nella direttiva UE relativa alla "protezione degli animali utilizzati a fini scientifici" con la stessa regolamentazione precedentemente adottata per i vertebrati (direttiva 2010/63/UE) a cui ha fatto seguito il D.L. 4 marzo 2014, n. 26 (Polese et al. 2014; Smith et al. 2013).

ALLEVAMENTO E MANAGEMENT DEI CEFALOPODI

I cefalopodi sono considerati da tempo come modelli sperimentali in molte aree di ricerca, in particolare in neuroscienze e fisiologia (Gilbert et al. 1990) e l'attuale ricerca scientifica si basa sempre di più sul mantenimento di animali sani in laboratorio. Tuttavia, la storia dell'allevamento dei cefalopodi non è così antica (tranne, forse, per le ricerche di Grimpe 1928), con importanti progressi a partire da circa cinquant'anni fa (Choe and Ohshima 1961; Itami et al. 1963) quando sono state gettate le basi per l'allevamento di questi molluschi.

Un recente impulso al miglioramento delle pratiche di allevamento dei cefalopodi è scaturito principalmente dalla comunità di ricerca biomedica attratta dal sistema nervoso altamente sviluppato di questi molluschi e dalle loro avanzate capacità visive (Hanlon 1987; Koueta and Boucaud-Camou 1999). Stimoli per la coltura di questi animali so-

no l'industria globale in rapida crescita per l'acquariofilia, principalmente polpi e seppie, e la tendenza mondiale nell'acquacoltura commerciale per la produzione di organismi a scopo alimentare.

Come conseguenza di questa crescente attenzione all'allevamento dei cefalopodi, negli ultimi decenni ci sono stati periodici progressi nel campo dell'acquacoltura (Hanlon 1987; Hanlon 1988; Hanlon 1998; Hanlon et al. 1999a; Hanlon et al. 2009; Hanlon et al. 2013; Hanlon et al. 1999b; Villanueva and Norman 2008; Villanueva et al. 1995; Villanueva et al. 1997), dovuti alla valutazione del potenziale espresso da alcune specie (Lee et al. 1994a; Rosas et al. 2013; Sykes et al. 2006; Vaz-Pires et al. 2004), caratterizzate da un ciclo vitale breve ed elevati indici di crescita (Rodhouse et al. 2014). Negli ultimi anni i cambiamenti ambientali antropogenici (suriscaldamento delle acque, riduzione drastica degli stock ittici dovuti ad un eccessivo sfruttamento), hanno portato ad un sostanziale aumento della biomassa mondiale in controtendenza con il depauperamento degli altri stock ittici conseguenti a politiche di pesca intensiva e *overfishing* (Doubleday et al. 2016).

Dalle delicate forme planctoniche agli adulti bentonici, una varietà di specie e fasi di vita sono state mantenute, allevate e coltivate, con diversi gradi di successo. La maggior parte delle specie considerate sono cefalopodi costieri per la facilità di cattura, il mantenimento e la disponibilità di una notevole mole di informazioni riguardanti i loro cicli vitali.

Tra le specie più diffuse e commercializzate per scopi alimentari in Italia ci sono il Calamaro, la Seppia, il Polpo, il Moscardino e il Totano (Boyle and Rodhouse 2005). In Asia, in special modo nelle Filippine, viene consumato e apprezzato anche il *Nautilus pompilius*.

I cefalopodi hanno molte caratteristiche considerate favorevoli e attraenti per l'acquacoltura. Tra quelle che meritano attenzione, oltre ai loro cicli di vita brevi (per lo più tra 4 e 18 mesi) è da considerare, la facilità nell'ottenere grandi quantità di uova, infatti molte specie, in particolare polpo e seppia,

le depongono prontamente quando vengono introdotte in cattività. La fertilità di alcune specie risulta piuttosto elevata e paragonabile alle specie ittiche (Saville 1987), con conseguente produzione di un gran numero di paralarve planctoniche, mentre altre specie che mostrano bassa fertilità producono grandi uova e piccoli bentonici (Fig. 1). Questi piccoli, a sviluppo diretto, sono miniature degli adulti, con un sistema nervoso altamente sviluppato e abilità predatorie innate. Il tasso di crescita di alcuni cefalopodi è impressionante, compreso tra il 5 e il 13% del peso corporeo umido al giorno ($WW\ d^{-1}$) (Lee et al. 1994a; Lee et al. 1994b) che combinato con alti tassi di conversione alimentare del 30-50% (Lee et al. 1994a; O'Dor and Wells 1978) li rendono uno dei gruppi più interessanti di invertebrati marini considerati adatti per l'acquacoltura. Inoltre, i cefalopodi sono apprezzati come alimento ad alto contenuto proteico (75-85% di peso secco proteico) e per il fatto che l'80-85% del loro peso corporeo totale è commestibile per il consumo umano (Lee et al. 1994a; Lee et al. 1994b). Ciò rappresenta un impatto significativo sulla redditività e sulla capacità di mercato, in particolare se confrontato con il solo il 40-45% dei crostacei e il 40-75% dei pesci teleostei (Kreuzer 1984). Le implicazioni di queste caratteristiche biologiche per la coltura commerciale sono evidenti e si traducono in brevi cicli di coltura con elevati rapporti di produzione in biomassa e di conseguenza un elevato rapporto costi-benefici. Tuttavia, la redditività dipende anche da altri fattori, come la domanda, i mercati e l'alto valore commerciale. È quindi importante valutare i mercati che potrebbero sostenere potenziali iniziative commerciali che coinvolgano l'acquacoltura dei cefalopodi.

La domanda attuale dipende quasi esclusivamente da stock catturati in natura, ma è improbabile che la pesca possa continuare a soddisfare la domanda. Il declino di molti stock ittici ha aumentato la pressione di pesca sui cefalopodi, ampliando la loro importanza commerciale e il conseguente rapido aumento delle statistiche sulle catture negli ultimi decenni (Pierce and Portela 2014;

Rodhouse et al. 2014). La pesca globale di cefalopodi è aumentata costantemente dal 1950 da un totale di 0.5 milioni di tonnellate all'anno con un picco di oltre 4 milioni di tonnellate nel 2007, seguito da un recente calo a 3.5 milioni di tonnellate nel 2010 (Pierce and Portela 2014). Pertanto, il trend a lungo termine sembra indicare che gli anni del boom della pesca dei cefalopodi potrebbero essere terminati a causa della pesca eccessiva. Questo trend segue la diffusa percezione che la produzione della pesca in generale stia diminuendo in tutto il mondo (Hilbor 2012; Rodhouse et al. 2014; Worm et al. 2009).

Tuttavia, esiste un mercato consolidato e redditizio per i cefalopodi nei paesi europei e asiatici. La maggior parte dei paesi europei sono importatori di cefalopodi e la Spagna e l'Italia sono in cima alla lista degli importatori (importano più di 5 e 4 milioni di tonnellate, rispettivamente). Durante il 1976 e il 2009, il Giappone ha importato più cefalopodi di qualsiasi altro paese (7 milioni di tonnellate), raggiungendo il più grande deficit netto totale import-export di qualsiasi paese del mondo (Pierce and Portela 2014). Ad esempio le statistiche sul commercio dei cefalopodi enfatizzano la limitata disponibilità di polpi nel 2011 (Globefish 2012) e le cifre per gli anni a seguire indicano che il Giappone aumenterà ulteriormente le sue importazioni di polpi. Anche per i calamari e le seppie, le importazioni stanno aumentando (Pierce and Portela 2014), quindi chiaramente c'è una domanda crescente di cefalopodi in Europa e in Giappone e nei mercati di esportazione. Se la pesca mondiale dei cefalopodi continuerà a mostrare un declino, l'aumento della domanda tenderà ad aumentare i prezzi, il che rappresenterà sicuramente lo stimolo più efficace per lo sviluppo dell'acquacoltura dei cefalopodi come l'unica alternativa plausibile per soddisfare la domanda. Inoltre la necessità di destagionalizzare il loro reperimento in commercio, trova nell'acquacoltura una possibile risposta (Kunisaki 2000; Ruíz-Capillas et al. 2002).

La produzione è in gran parte limitata dalle abitudini alimentari altamente selettive dei cefalopodi, che sono carnivori e quindi ne-

cessitano di una dieta a base di proteine con lipidi di alta qualità ricchi di acidi grassi essenziali, fosfolipidi e colesterolo. Soddisfare i loro voraci appetiti richiede grandi quantità di cibo, preferibilmente vivo. A causa dei loro alti tassi metabolici e di alimentazione (20-50% WW d¹; (Hanlon 1987; Lee et al. 1994a), se le loro esigenze nutrizionali non vengono soddisfatte, possono morire di fame rapidamente e fin dalla tenera età ricorrono al cannibalismo (vedi, ad esempio, Ibáñez and Keyl 2010). Le prime fasi dello sviluppo sono particolarmente vulnerabili poiché richiedono, per sostenere i loro tassi di alimentazione esorbitanti, mangime vivo di dimensioni, forma e mobilità specifiche, poiché sono cacciatori visivi ed olfattivi (80% del WW d¹; Di Cosmo et al. 2018b; Hanlon 1987; Segawa 1990). L'allevamento delle paralarve e la produzione di giovani su base commerciale sono stati gravemente limitati da questi fattori, insieme a una conoscenza insufficiente delle loro abitudini alimentari e dei tipi di cibo, causando alti tassi di mortalità durante i primi stadi di vita in cattività. Ciò sottolinea la necessità di trovare una fornitura affidabile di mangime vivo per le paralarve o di sviluppare mangimi artificiali convenienti. Come per altre specie di acquacoltura marina commerciale, concentrarsi sui miglioramenti nutrizionali è una strategia necessaria per abbreviare i tempi di raggiungimento delle taglie commerciali.

La coltura dei cefalopodi su piccola scala è già possibile per alcune specie, come il calamaro della barriera corallina, *Sepio-teuthis lessoniana* (Lesson, 1839), la seppia europea, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758); il polpo messicano, *Octopus maya* (Voss e Solis, 1966), e il polpo comune, *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). Tutte queste specie selezionate, ad eccezione di *O. vulgaris*, producono prole di grandi dimensioni senza una fase paralarvale planctonica vulnerabile. Invece risulta decisamente proibitivo l'allevamento di *Nautilus*, in quanto richiederebbe delle temperature estremamente basse, considerato che questi animali vivono a oltre 500 metri di profondità, o di calamari che mal si adattano alla cattività.

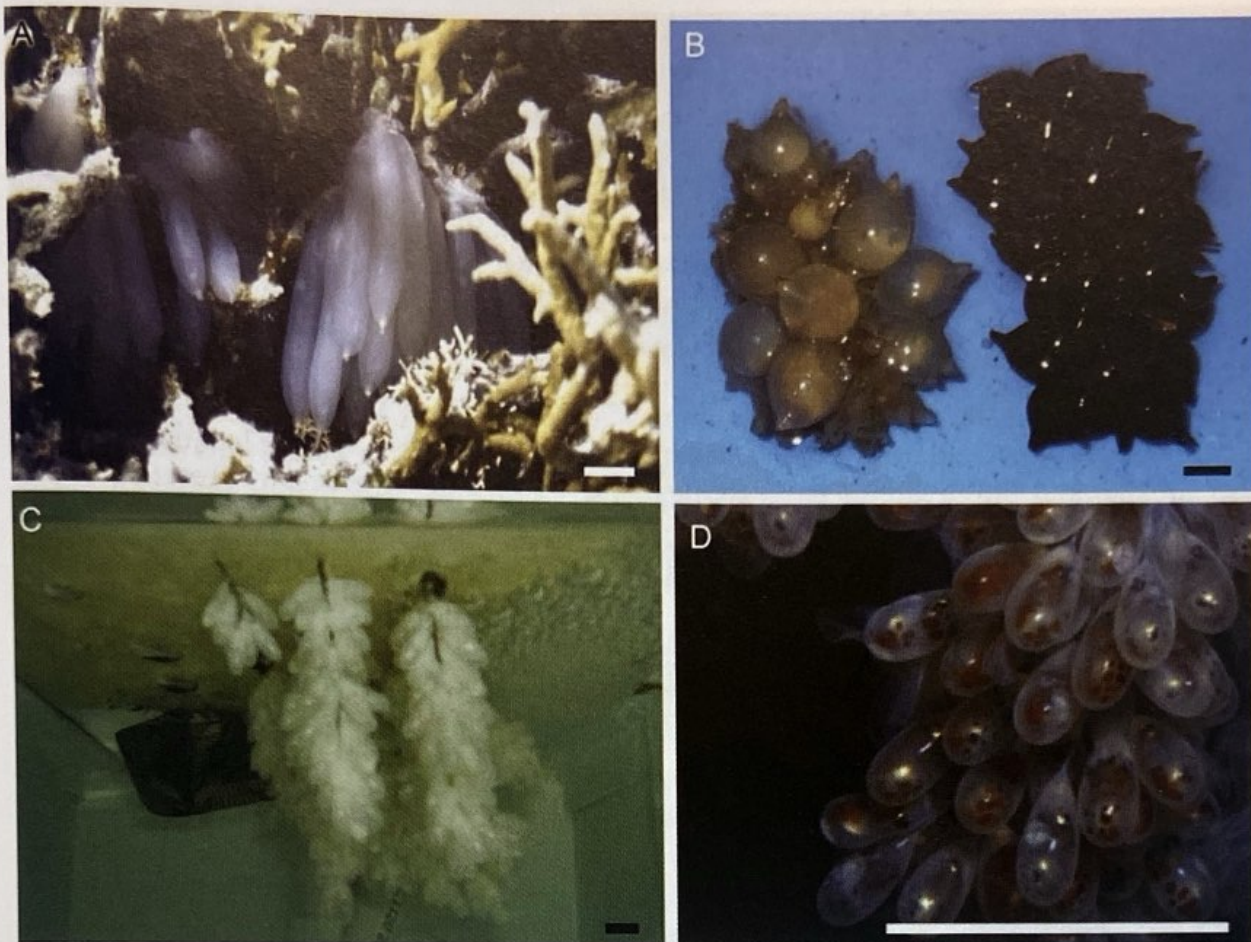


Fig. 1 – Uova di cefalopodi. (A) *Sepioteuthis lessoniana*, (B) *Sepia officinalis*, (C) *Octopus maya* and (D) *Octopus vulgaris*. Scale bar 1 cm. (Vidal et al. 2014)

Le seppie sono animali stupendi sia per gli straordinari colori che per la singolare intelligenza. Le seppie possiedono dieci tentacoli ciascuno con due fila di ventose dei quali due sono destinati all'alimentazione e vengono allungati in pochissimi istanti per catturare e portare al becco la preda. Possiedono tre cuori, un cervello complesso ed hanno una durata di vita compresa dai sei mesi ai tre anni. Cambiano colore in modo sorprendente. Il cambiamento di colore repentino permette di confondere sia prede che predatori, quest'ultimi possono essere disorientati anche dal getto d'inchiostro meglio conosciuto come il "nero di seppia". Sono predatori fenomenali, inseguono le loro prede con astuzia ed attaccano con precisione, velocità e abilità. Quando sono allevati con il tempo imparano a riconoscere chi le nutre.

La specie di seppia maggiormente usata per l'acquacoltura è *Metasepia pfefferi*

(Grasse et al. 2014). In natura essa si trova a profondità comprese tra 3 e 90 metri, principalmente nelle acque del Sud Est asiatico e in Australia. Il suo habitat naturale sono il sedimento e il fango, mentre è meno comune su substrati rocciosi poiché risulta essere troppo visibile alle sue prede anche se tali substrati sono invece ampiamente utilizzati per la deposizione e l'ancoraggio delle uova. Il problema principale del mantenimento in acquario di piccole seppie (*Metasepia pfefferi* e *Sepia bandensis*) è dato dal reperimento di animali sani in quanto i combattimenti che avvengono durante il trasporto portano a lesioni o ad infezioni che possono essere letali. Gli animali sani possono essere mantenuti in acquario per tutta la durata della vita naturale, fino alla senescenza. Le seppie, essendo molto piccole, possono essere allevate anche in piccole vasche, circa 40 litri per esemplare, sviluppate in al-

tezza per dare alle seppie la sensazione di profondità.

Le *Metasepia pfefferi* e le *Sepia bandensis* (Vidal et al. 2014) provenendo dal sud est asiatico (ad es. dalle *Filippine*) sono allevate bene in acqua alla temperatura di circa 28°C, pH compreso tra 8.1-8.4 e ammoniaca, nitriti e nitrati quanto più possibile vicini allo zero, privi di metalli pesanti. Prima di inserire le piccole seppie l'acquario deve essere ben maturo. L'acquario dev'essere dotato non solo di filtrazione meccanica, ma anche di schiumatoio e filtro a carboni attivi per far fronte ad eventuali spruzzi di inchiostro. Infine è consigliabile effettuare un cambio mensile del 25-50% di acqua.

Gli animali devono alloggiare in vasche dotate di tane abbastanza ariose e un letto di sabbia alto almeno 0.5 centimetri per consentirgli di scavare.

Per quando riguarda la dieta le seppie, essendo predatori, in natura mangiano soprattutto crostacei e pesci, e sembra che il movimento della preda provochi in loro lo stimolo della caccia. In acquario questi animali potrebbero essere nutriti con crostacei e pesci marini comprati nei negozi di acquariofilia, anche se risulterebbe molto costoso, oppure, utilizzare pesce o crostacei freschi o congelati, ma gli esemplari allevati vanno prima abituati a questo genere di alimenti, ad esempio simulando il movimento di una preda viva. Le seppie devono essere alimentate quotidianamente poiché hanno un metabolismo molto accelerato.

Grandi sforzi si stanno concentrando per la messa in opera del farming dei polpi, che rappresentano dei candidati ideali per tali scopi. I polpi infatti vivono poco, crescono rapidamente e maturano presto, e tipicamente raggiungono due-tre chili (un peso elevatissimo per un invertebrato). Nonostante sia considerato un candidato ideale per l'acquacoltura, attualmente è difficile coltivare i primi stadi di vita dei polpi e mantenere un alto tasso di sopravvivenza per le loro paralarve, che rappresentano attualmente lo step critico e limitante (Aguado Giménez and García García 2002; Carrasco et al. 2006).

In particolare, negli ultimi anni, sono stati condotti studi concernenti l'allevamento estensivo di *Octopus vulgaris* e di *Sepia officinalis*, in Portogallo e in Tunisia (Sykes et al. 2006), *Octopus maya* in Messico (Rosas et al. 2013), *Octopus ocellatus* in Asia (Segawa and Nomoto 2002), *Octopus mimus* in Sud America (Baltazar et al. 2000), *Octopus bimaculoides* in America (Solorzano et al. 2009). Attualmente i polpi vengono, da diversi anni, allevati e riprodotti in cattività con successo (soprattutto negli States). Tuttavia siamo ben lontani dall'allevamento intensivo a scopi alimentari che si sta orientando soprattutto sul polpo comune del Mediterraneo (*Octopus vulgaris*), ma anche sul polpo californiano (*Octopus bimaculoides*) che meglio si prestano all'allevamento in cattività (Iglesias et al. 2014).

Il polpo conduce una vita solitaria e fenomeni di cannibalismo sono molto comuni, pertanto devono essere isolati dai conspecifici. Inoltre, i polpi sono animali molto inclini alla fuga pertanto le vasche devono essere ben chiuse e il coperchio deve essere strettamente fissato. I polpi hanno una enorme superficie corporea e di conseguenza sono molto sensibili alla qualità dell'acqua, quindi inquinanti quali ammoniaca e nitriti dovrebbero essere tenuti a zero. I nitrati sembrano essere tollerati fino alla concentrazione di 50-100 ppm senza effetti apparenti. Il rame risulta invece letale anche a bassissime concentrazioni e dovrebbe essere testato prima dell'introduzione del polpo in acquario. Per tutti gli altri parametri si possono seguire le linee guida comuni per gli invertebrati di acquario marino. È importante sapere che un polpo produce una quantità di ammoniaca tre volte superiore a quella prodotta da pesci delle medesime dimensioni corporee; inoltre, è necessario mantenere i livelli di ossigenazione dell'acqua più alti possibili in quanto, essendo i polpi dotati di tre cuori, anche il fabbisogno d'ossigeno è di tre volte superiore rispetto a quello di un pesce.

Proprio perchè tali animali richiedono acqua molto ossigenata, nonostante la produ-

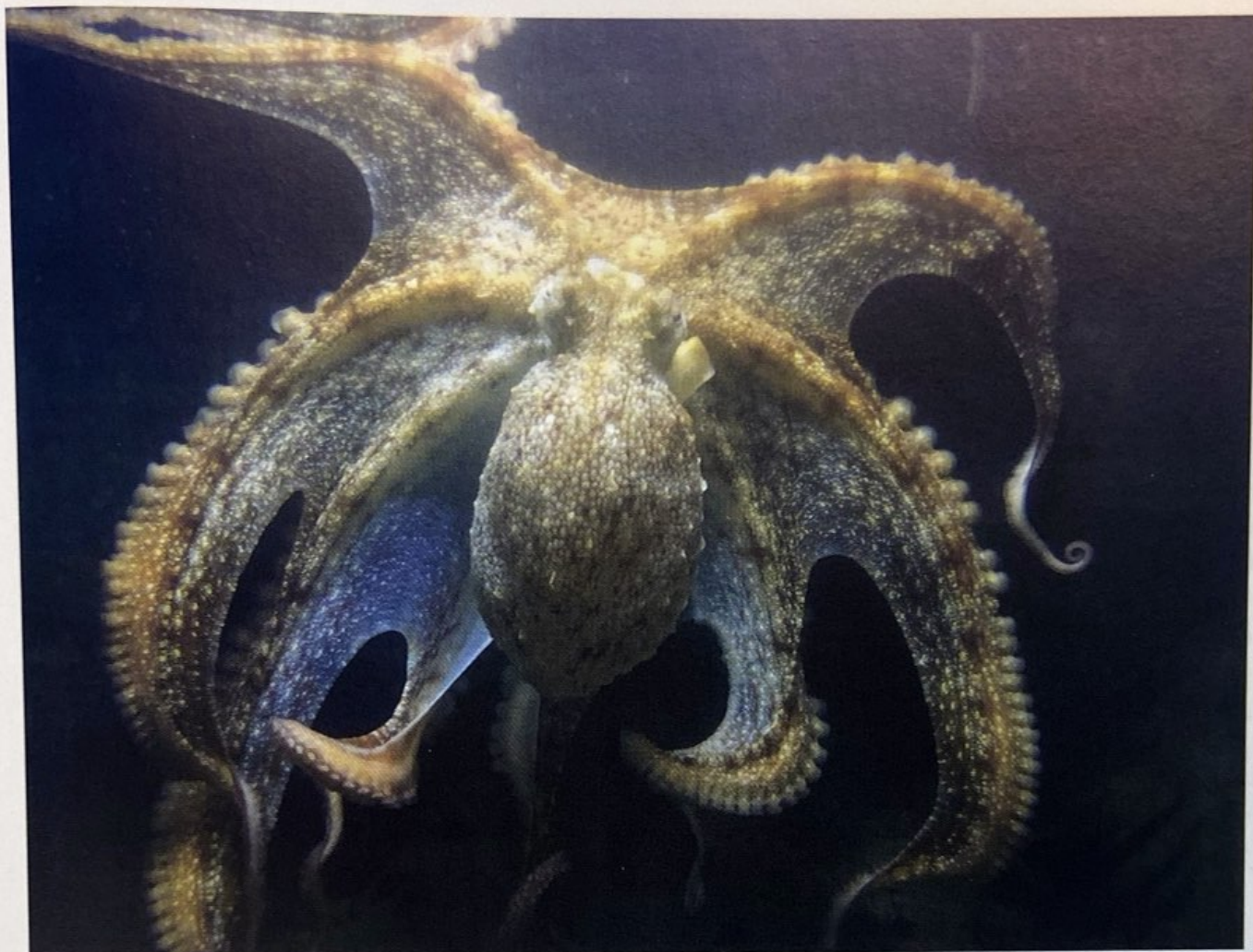


Fig. 2 – Polpo *Octopus vulgaris* coinvolto nella sperimentazione animale nello stabulario del Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II – Di Cosmo's facilities.

zione di rifiuti biologici, è utile utilizzare filtri sovradimensionati e ottimi schiumatoi.

Anche i polpi, quando si sentono minacciati possono emettere una nuvola di inchiostro molto viscosa, ad altissima densità proteica. Nonostante tale inchiostro non presenti velenosità, esso potrebbe coprire le branchie dell'animale, uccidendolo per asfissia. Un ottimo schiumatoio unito a dei carboni attivi di ottima qualità sono di solito sufficienti per eliminare l'inchiostro dalla vasca.

La salinità è l'altro parametro critico dell'acqua da tenere strettamente sotto controllo. Il valore a cui puntare per la salinità è sempre quello di 1.026, tenendo presente che una bassa salinità ucciderà il polpo. Il pH deve essere mantenuto tra 8 e 8.4 ed è necessario un cambio d'acqua del 25% ogni quindici giorni. La temperatura di allevamento consigliata va dai 16 ai 22°C.

ALLEVAMENTO A SCOPO SCIENTIFICO

I cefalopodi sono stati utilizzati nella ricerca da oltre 100 anni, per la loro plasticità fenotipica, per un sistema nervoso complesso e centralizzato, per gli studi sull'apprendimento e la memoria e per delle caratteristiche anatomiche che facilitano gli studi fisiologici (ad es. l'assone gigante del calamaro). Il 1° gennaio 2013, la ricerca che utilizza una delle circa 700 specie esistenti di "cefalopodi vivi" è stata regolamentata all'interno dell'Unione europea dalla direttiva 2010/63, accolta dalla legislazione italiana con decreto legislativo n° 26/2014, conferendo ai cefalopodi la stessa protezione offerta precedentemente solo ai vertebrati. La direttiva ha notevoli implicazioni per la ricerca nel campo delle neuroscienze e la comunità scientifica ha prodotto "linee guida"

per l'utilizzo dei cefalopodi nella sperimentazione animale (Fiorito et al. 2014; Polese et al. 2014; Winlow and Di Cosmo 2019; Winlow et al. 2018) dando particolare enfasi al benessere dei cefalopodi.

Tra i cefalopodi i più utilizzati per l'allevamento a scopo scientifico ritroviamo polpi (in particolare *Octopus vulgaris*) e il calamaro sepiolide (*Euprymna scolopes*).

Euprymna scolopes (conosciuto anche come calamaro delle Hawaii) è originario dell'Oceano Pacifico centrale, dove è presente in acque costiere poco profonde al largo delle Isole Hawaii e dell'Isola di Midway. L'*E. scolopes* cresce fino a 30 millimetri di lunghezza del mantello. I piccoli pesano 0,005 grammi e maturano in 80 giorni mentre gli adulti pesano fino a 2,67 grammi. In natura, l'*E. scolopes* si nutre in particolare di gamberetti, mentre in laboratorio è allevato con una dieta variegata che comprende misidi e artemie. *E. scolopes* è stata a lungo studiata a causa della relazione simbiotica con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*, che colonizza uno speciale organo luminoso nel mantello del calamaro.

Il polpo *O. vulgaris* (Fig. 2) è allevato in cattività soprattutto per studiarne le incredibili capacità cognitive legate ad una straordinaria intelligenza (Di Cosmo et al. 2018b), che vanno dal problem solving al gioco, e alla capacità di effettuare neurogenesi adulta (Bertapelle et al. 2017; Di Cosmo et al. 2018a). Tuttavia gli esperimenti comportamentali su tali animali possono essere effettuati solo con animali pescati *ad hoc* dall'ambiente, ed allevati in stabulario (Di Cosmo et al. 2015).

In stabulario i polpi hanno una aspettativa di vita che va dai 6 mesi ai 15 mesi. Solo alcune specie abissali e di acque fredde, come *Barhytopolypus articus*, hanno una aspettativa di vita maggiore, che può arrivare a 6 anni. Il polpo è un animale dalle dimensioni variabili e per tali esemplari è consigliata una vasca di almeno 100 litri.

L'intelligenza dei polpi richiede un ambiente arricchito, che consiste nell'inserimento di oggetti all'interno della vasca. Il modo più semplice per fare tutto ciò consiste nell'inserimento di una tana, rocce, conchi-

glie di taglia mista e vari tipi di oggetti (barrattoli, lego, etc); il polpo apprezzerà e magari utilizzerà tali accessori per costruire la porta della propria tana.

La maggior parte dei polpi sono animali notturni, ma generalmente cambiano le loro abitudini in base al momento della giornata in cui vengono nutriti. In natura la dieta di un polpo consiste soprattutto in crostacei, anche se la maggior parte degli esemplari accetterà di buon grado tranci di pesce. Il cibo può essere proposto anche con una pinza, al fine di guadagnare l'approvazione dell'animale e migliorare le relazioni operatore-animale. Per consentire una veloce acclimatazione dei polpi, è consigliato mantenere sempre la luce soffusa.

LIMITAZIONI ATTUALI

Si sono registrati progressi significativi nei metodi di coltura dei cefalopodi ed oggi è possibile allevare molte specie per periodi relativamente lunghi nei laboratori e nelle strutture acquatiche. Tuttavia per alcune specie, ci sono ancora alcuni ostacoli importanti da superare prima che diventi possibile sostenere l'acquacoltura per più cicli di vita a un livello di produzione industrialmente stabile ed economicamente sostenibile.

La progettazione di base del sistema di acquacoltura dei cefalopodi è passata da progetti rettangolari-cubici a circolari-cilindrici, popolati con semplici unità abitative a base di tubi dove i polpi sono disposti in circolo per sfruttare appieno i volumi d'acqua. Il rilascio dei mangimi negli acquari di grandi dimensioni è generalmente manuale e casuale, con alcuni animali che tendono a dominare durante la fase di alimentazione, con conseguenti tassi di crescita e gamma di dimensioni variabili.

I requisiti di qualità dell'acqua aumentano i rischi per l'acquacoltura su larga scala in assenza di un sistema di acqua di mare aperto che sia stabile a lungo termine e di alta qualità, poiché tutti i cefalopodi sono altamente vulnerabili alla presenza di inquinanti artificiali e improvvisi cambiamenti di parametri

quali temperatura, salinità, pH e concentrazioni di vari soluti. È quindi necessario prevedere un monitoraggio efficiente, una misurazione particolarmente regolare del pH e del contenuto di composti azotati all'aumentare della biomassa coltivata, facendo attenzione a non superare la capacità del sistema. I sistemi di acquacoltura richiedono il mantenimento delle temperature vicino a quelle della popolazione naturale (Boyle 1991), con un'attenta valutazione del fabbisogno energetico per il raffreddamento e il riscaldamento, se le temperature utilizzate e quelle naturali sono significativamente diverse.

Uno dei maggiori "colli di bottiglia" presenti nell'acquacoltura dei cefalopodi è la produzione di quantità sufficienti di prole di qualità. Ciò è direttamente correlato al controllo della riproduzione che rimane una pietra miliare per lo sviluppo dell'acquacoltura dei cefalopodi. La qualità e la quantità di uova e piccoli, dipenderanno dalle influenze ambientali durante il processo di maturazione e durante lo sviluppo embrionale. È stato dimostrato che la vitalità delle uova si riduce dopo diverse generazioni di coltura a causa della consanguineità (ad esempio Walsh et al. 2002); quindi, il controllo sulla riproduzione è necessario per raggiungere la produzione di massa. La fase paralarvale e il periodo di insediamento sul fondo, in un certo numero di specie che producono uova piccole, hanno dimostrato di essere "colli di bottiglia" critici. Ad oggi tutte le specie con una fase paralarvale possono essere allevate solo sperimentalmente, in numeri che risultano essere troppo bassi per essere commercialmente praticabili.

La nutrizione è un problema comune alla coltura della maggior parte delle specie di cefalopodi e di molte fasi del loro ciclo vitale, in quanto si sa poco su (1) cosa mangiano in natura i cefalopodi in diverse fasi della vita, (2) la loro fisiologia nutrizionale e (3) come e quando presentare alimenti adeguati in un sistema chiuso.

L'intelligenza straordinariamente elevata dei cefalopodi ha portato al riconoscimento dell'importanza dell'arricchimento (ad esempio Wood and Wood 1999), come il

gioco e altre forme di stimolazione che potrebbero fornire distrazione da tratti comportamentali negativi come il cannibalismo (Budelmann 2010). L'assenza di opportunità di arricchimento dell'ambiente in cattività, in particolare per i polpi, può abbassare il grado di salute e quindi la crescita ottimale richiesta per l'acquacoltura commerciale.

In termini di possibili limitazioni future, il valore della policoltura (per superare le limitazioni della resa per unità di volume d'acqua) a livello commerciale non è ancora stato studiato. Le alghe sono state utilizzate come parte del filtraggio in serie durante il ritrattamento dell'acqua in circuiti chiusi (vedi, ad esempio Yang et al. 1989), ma la policoltura in termini di tentativi di raccogliere gli scarti e il cibo non consumato dai sistemi di coltura dei polpi è in gran parte inesplorato (Al-Hafedh et al. 2012; Martínez-Porchas et al. 2010).

Infine il dilemma etico di coltivare animali intelligenti come i cefalopodi come fonte di cibo deve ancora essere esplorato come possibile limitazione.

BIBLIOGRAFIA

- Aguado Giménez, F. & B. García García, 2002. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): Influence of body weight, temperature, sex and diet. *Aquaculture International* 10(5):361-377.
- Al-Hafedh, Y. S., A. Alam, A. H. Buschmann & K. M. Fitzsimmons, 2012. Experiments on an integrated aquaculture system (seaweeds and marine fish) on the Red Sea coast of Saudi Arabia: efficiency comparison of two local seaweed species for nutrient biofiltration and production. *Reviews in Aquaculture* 4(1):21-31.
- Albertin, C. B., O. Simakov, T. Mitros, Z. Y. Wang, J. R. Pungor, E. Edsinger-Gonzales, S. Brenner, C. W. Ragsdale & D. S. Rokhsar, 2015. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* 524(7564):220-4.
- Baltazar, P., P. Rodríguez, W. Rivera & V. Valdivieso, 2000. Cultivo experimental de

- Octopus mimus*, Gould 1852 en el Perú. Rev Peru Biol 7(2):151–160.
- Bertapelle, C., G. Polese & A. Di Cosmo, 2017. Enriched Environment Increases PCNA and PARP1 Levels in *Octopus vulgaris* Central Nervous System: First Evidence of Adult Neurogenesis in Lophotrochozoa. J Exp Zool B Mol Dev Evol.
- Boyle, P. R., 1991. The UFAW Handbook on the Care and Management of Cephalopods in the Laboratory. Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, UK.
- Boyle, P. R. & P. G. Rodhouse, 2005. Cephalopods: Ecology and fisheries. Blackwell, Oxford, England.
- Budelmann, B. U., 2010. Cephalopoda. UFAW Handbook On the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals:787-793.
- Buresch, K. C., K. M. Ulmer, D. Akkaynak, J. J. Allen, L. M. Mäthger, M. Nakamura & R. T. Hanlon, 2015. Cuttlefish adjust body pattern intensity with respect to substrate intensity to aid camouflage, but do not camouflage in extremely low light. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 462:121-126.
- Carrasco, J. F., J. C. Arronte & C. Rodríguez, 2006. Paralarval rearing of the common octopus, *Octopus vulgaris* (Cuvier). Aquaculture Research 37(15):1601-1605.
- Choe, S. & Y. Ohshima, 1961. On the embryonal development and the growth of the squid, *Sepioteuthis lessoniana* Lesson. Venus (Tokyo) 21(2):462–476.
- Crook, R. J. & E. T. Walters, 2011. Nociceptive Behavior and Physiology of Molluscs: Animal Welfare Implications. Ilar Journal 52:185-95.
- De Lisa, E., M. Paolucci & A. Di Cosmo, 2012. Conservative nature of oestradiol signalling pathways in the brain lobes of *Octopus vulgaris* involved in reproduction, learning and motor coordination. J Neuroendocrinol 24(2):275-84.
- De Lisa, E., A. M. Salzano, F. Moccia, A. Scaloni & A. Di Cosmo, 2013. Sperm-attractant peptide influences the spermatozoa swimming behavior in internal fertilization in *Octopus vulgaris*. Journal of Experimental Biology 216(12):2229-2237.
- Di Cosmo, A., C. Bertapelle, A. Porcellini & G. Polese, 2018a. Magnitude Assessment of Adult Neurogenesis in the *Octopus vulgaris* Brain Using a Flow Cytometry-Based Technique. Frontiers in physiology 9:1050.
- Di Cosmo, A., V. Maselli & G. Polese, 2018b. *Octopus vulgaris*: An Alternative in Evolution. Results Probl Cell Differ 65:585-598.
- Di Cosmo, A., G. Polese, C. Bertapelle, A. Palumbo & Z. L., 2015. Cefalopodi. Benessere ed animal care dell'animale da laboratorio. Le Point Veterinaire Italie, Milano.
- Doubleday, Z. A., T. A. A. Prowse, A. Arkhipkin, G. J. Pierce, J. Semmens, M. Steer, S. C. Loporati, S. Lourenço, A. Quetglas, W. Sauer & B. M. Gillanders, 2016. Global proliferation of cephalopods. Current Biology 26(10):R406-R407.
- Fiorito, G., A. Affuso, D. B. Anderson, J. Basil, L. Bonnaud, G. Botta, A. Cole, L. D'Angelo, P. De Girolamo, N. Dennison, L. Dickel, A. Di Cosmo, C. Di Cristo, C. Gestal, R. Fonseca, F. Grasso, T. Kristiansen, M. Kuba, F. Maffucci, A. Manciooco, F. C. Mark, D. Melillo, D. Osorio, A. Palumbo, K. Perkins, G. Ponte, M. Raspa, N. Shashar, J. Smith, D. Smith, A. Sykes, R. Villanueva, N. Tublitz, L. Zullo & P. Andrews, 2014. Cephalopods in neuroscience: regulations, research and the 3Rs. Invertebrate Neuroscience 14(1):13-36.
- Frank, M. G., R. H. Waldrop, M. Dumoulin, S. Aton & J. G. Boal, 2012. A Preliminary Analysis of Sleep-Like States in the Cuttlefish *Sepia officinalis*. PLoS ONE 7.
- Gilbert, D. L., W. J. Adelman Jr. & J. M. Arnold, 1990. Squid as Experimental Animals. Plenum Press, New York.
- Globefish, 2012. Globefish highlights FAO/ Globefish. vol 58.
- Godfrey-Smith, P., 2016. Other Minds: The Octopus, the Sea, and the Deep Origins of Consciousness. Farrar, Straus and Giroux.

- Grasse, B., A. Li & B. m. Org, 2014. The Biological Characteristics, Life Cycle, and System Design for the Flamboyant and Paintpot Cuttlefish, *Metasepia* sp., Cultured Through Multiple Generations.
- Grasso, F. W. & J. A. Basil, 2009. The Evolution of Flexible Behavioral Repertoires in Cephalopod Molluscs. *Brain Behav Evol* 74(3):231-45.
- Grimpe, G., 1928. Pflege, Behandlung und Zucht der Cephalopoden für zoologische und physiologische Zwecke Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden Urban und Schwarzenberg. Berlin, 331–402.
- Hanlon, R. T., 1987. Mariculture. In Boyle, P. R. (ed) *Cephalopod Life Cycles*. vol II. Comparative Reviews. Academic Press, London, 291–305.
- Hanlon, R. T., 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis*): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 320(1200):437.
- Hanlon, R. T., 1998. Mating systems and sexual selection in the squid *Loligo*: how might commercial fishing on spawning grounds affect them? *CalCOFI Reports* 39:92-100.
- Hanlon, R. T., S. A. Ament & H. Gabr, 1999a. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). *Mar Biol* 134(4):719-728.
- Hanlon, R. T., C.-C. Chiao, L. M. Mäthger, A. Barbosa, K. C. Buresch & C. Chubb, 2009. Cephalopod dynamic camouflage: bridging the continuum between background matching and disruptive coloration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1516):429-437.
- Hanlon, R. T., C.-C. Chiao, L. M. Mäthger & N. J. Marshall, 2013. A fish-eye view of cuttlefish camouflage using in situ spectrometry. *Biological Journal of the Linnean Society* 109(3):535-551.
- Hanlon, R. T., J. W. Forsythe & D. E. Joneschild, 1999b. Crypsis, conspicuousness, mimicry and polyphenism as antipredator defences of foraging octopuses on Indo-Pacific coral reefs, with a method of quantifying crypsis from video tapes. *Biological Journal of the Linnean Society* 66(1):1-22.
- Hanlon, R. T. & J. B. Messenger, 1996. *Cephalopod Behaviour*. Cambridge University Press.
- Hilbor, R., 2012. The evolution of quantitative marine fisheries management 1985-2010. *Natural Resource Modeling* 25(1):122-144.
- Hochner, B., T. Shomrat & G. Fiorito, 2006. The Octopus: A Model for a Comparative Analysis of the Evolution of Learning and Memory Mechanisms. *The Biological Bulletin* 210(3):308-317.
- Huffard, C. L., 2013. Cephalopod neurobiology: an introduction for biologists working in other model systems. *Invertebrate Neuroscience* 13(1):11-18.
- Hvorecny, L. M., J. L. Grudowski, C. J. Blakeslee, T. L. Simmons, P. R. Roy, J. A. Brooks, R. M. Hanner, M. E. Beigel, M. A. Karson, R. H. Nichols, J. B. Holm & J. G. Boal, 2007. Octopuses (*Octopus bimaculoides*) and cuttlefishes (*Sepia pharaonis*, *S. officinalis*) can conditionally discriminate. *Anim Cogn* 10(4):449-59.
- Ibáñez, C. M. & F. Keyl, 2010. Cannibalism in cephalopods. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20(1):123-136.
- Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva, 2014. *Cephalopod Culture*; Springer: Dordrecht:494.
- Itami, K., Y. Izawa, S. Maeda & K. Nakai, 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 29(6):514–520.
- Jereb, P. & C. F. E. Roper, 2005. *Cephalopods of the World: an annotated and illustrated catalogue of Cephalopod Species known to date*, Vol. 1, Chambered Nautiluses and Sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae). In: Purpose, F. S. C. f. F. (ed) 4. vol 1. FAO, Rome.
- Kingston, A. C. N., A. M. Kuzirian, R. T. Hanlon & T. W. Cronin, 2015. Visual phototransduction components in

- cephalopod chromatophores suggest dermal photoreception. *Journal of Experimental Biology* 218:1596-1602.
- Koueta, N. & E. Boucaud-Camou, 1999. Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 240(1):93-109.
- Kreuzer, R., 1984. Cephalopods: handling, processing and products. In: Paper, F. F. T. (ed). vol 254. FAO, Rome, Italy.
- Kunisaki, N., 2000. Nutritional Properties of Squid and Cuttlefish. In Okuzumi, M. & T. Fujii (eds) *Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish* National Cooperative Association of Squid Processors. vol 218, Japan.
- Lee, P. G., P. E. Turk, W. T. Yang & R. T. Hanlon, 1994a. Biological characteristics and biomedical applications of the squid *Sepioteuthis lessoniana* cultured through multiple generations. *Biol Bull* 186(3):328-41.
- Lee, P. G., P. E. Turk, W. T. Yang & R. T. Hanlon, 1994b. Biological Characteristics and Biomedical Applications of the Squid *Sepioteuthis lessoniana* Cultured Through Multiple Generations. *The Biological Bulletin* 186(3):328-341.
- Liscovitch-Brauer, N., S. Alon, H. T. Porath, B. Elstein, R. Unger, T. Ziv, A. Admon, E. Y. Levanon, J. J. Rosenthal & E. Eisenberg, 2017. Trade-off between Transcriptome Plasticity and Genome Evolution in Cephalopods. *Cell* 169(2):191-202 e11.
- Martínez-Porchas, M., L. R. Martínez-Córdova, M. A. Porchas-Cornejo & J. A. López-Elías, 2010. Shrimp polyculture: a potentially profitable, sustainable, but uncommon aquacultural practice. *Reviews in Aquaculture* 2(2):73-85.
- Mather, J. A., 2008. Cephalopod consciousness: behavioural evidence. *Consciousness and cognition* 17(1):37-48.
- Norman, M. D., J. Finn & T. Tregenza, 2001. Dynamic mimicry in an Indo-Malayan octopus. *Proceedings Biological sciences* 268(1478):1755-8.
- O'Dor, R. K. & M. J. Wells, 1978. Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*. *J Exp Biol* 77:15-31.
- Packard, A., 1972. Cephalopods and fish: the limits of convergence. *Biological Reviews* 47(2):241-307.
- Pierce, G. J. & J. Portela, 2014. Fisheries Production and Market Demand. In Iglesias, J., L. Fuentes & R. Villanueva (eds) *Cephalopod Culture*. Springer Netherlands, Dordrecht, 41-58.
- Pierce, G. J., V. D. Valavanis, A. Guerra, P. Jereb, L. Orsi-Relini, J. M. Bellido, I. Katara, U. Piatkowski, J. Pereira, E. Balguerias, I. Sobrino, E. Lefkaditou, J. Wang, M. Santurtun, P. R. Boyle, L. C. Hastie, C. D. MacLeod, J. M. Smith, M. Viana, A. F. González & A. F. Zuur, 2008. A review of cephalopod-environment interactions in European Seas. *Hydrobiologia* 612:49-70.
- Polese, G., W. Winlow & A. Di Cosmo, 2014. Dose-dependent effects of the clinical anesthetic isoflurane on *Octopus vulgaris*: a contribution to cephalopod welfare. *J Aquat Anim Health* 26(4):285-94.
- Pronk, R., D. R. Wilson & R. Harcourt, 2010. Video playback demonstrates episodic personality in the gloomy octopus. *Journal of Experimental Biology* 213:1035-41.
- Ramirez, M. D. & T. H. Oakley, 2015. Eye-independent, light-activated chromatophore expansion (LACE) and expression of phototransduction genes in the skin of *Octopus bimaculoides*. *J Exp Biol* 218(Pt 10):1513-20.
- Reiter, S., P. Hülshunk, T. Woo, M. A. Lauterbach, J. S. Eberle, L. A. Akay, A. Longo, J. Meier-Credo, F. Kretschmer, J. D. Langer, M. Kaschube & G. Laurent, 2018. Elucidating the control and development of skin patterning in cuttlefish. *Nature* 562:361-366.
- Rodhouse, P. G., G. J. Pierce, O. C. Nichols, W. H. Sauer, A. I. Arkhipkin, V. V. Laptikhovskiy, M. R. Lipinski, J. E. Ramos, M. Gras, H. Kidokoro, K. Sadayasu, J. Pereira, E. Lefkaditou, C. Pita, M. Gasalla, M. Haimovici, M. Sakai & N. Downey, 2014. Environmental

- effects on cephalopod population dynamics: implications for management of fisheries. *Adv Mar Biol* 67:99-233.
- Rosas, C., A. Valero, C. Caamal-Monsreal, I. Uriarte, A. Farias, P. Gallardo, A. Sánchez & P. Domingues, 2013. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquaculture Research* 44(7):1029-1044.
- Ruíz-Capillas, C., A. Moral, J. Morales & P. Montero, 2002. Characterisation of non-protein nitrogen in the Cephalopods volador (*Illex coindetii*), pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). *Food Chem* 76(2):165-172.
- Saville, A., 1987. Comparisons between cephalopods and fish of those aspects of the biology related to stock management. *Cephalopod Life Cycles, Vol II Comparative Reviews* 2:277-290.
- Segawa, S., 1990. Food Consumption, Food Conversion and Growth Rates of the Oval Squid *Sepioteuthis lessoniana* by Laboratory Experiments. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(2):217-222.
- Segawa, S. & A. Nomoto, 2002. Laboratory growth, feeding, oxygen consumption and ammonia excretion of *Octopus ocellatus*. *Bulletin of Marine Science* 71(2):801-813.
- Smith, J. A., P. L. R. Andrews, P. Hawkins, S. Louhimies, G. Ponte & L. Dickel, 2013. Cephalopod research and EU Directive 2010/63/EU: Requirements, impacts and ethical review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 447:31-45.
- Solorzano, Y., M. T. Viana, L. M. López, J. G. Correa, C. C. True & C. Rosas, 2009. Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. *Aquaculture* 289(1):84-90.
- Sykes, A. V., P. M. Domingues, M. Correia & J. P. Andrade, 2006. Cuttlefish culture - state of the art and future trends. *Vie Milieu* 56(2):129-137.
- Vaz-Pires, P., P. Seixas & A. Barbosa, 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture* 238(1):221-238.
- Vidal, E., R. Villanueva, J. P. Andrade, I. Gleadall, J. Iglesias, N. Koueta, C. Rosas, S. Segawa, B. Grasse, R. Franco-Santos, C. Albertin, C. Caamal-Monsreal, M. Chimal, E. Edsinger, P. Gallardo, C. Le Pabic, C. Pascual, K. Roubledakis & J. Wood, 2014. Cephalopod culture: current status of main biological models, and research priorities, in: Vidal, E.A.G (Ed.), *Advances in cephalopod science, biology, ecology, cultivation and fisheries*. *Advances in Marine Biology* 67:1-98.
- Villanueva, R. & M. D. Norman, 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. In Gibson, R. N., A. R.J.A. & J. D. M. Gordon (eds) *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*. vol 46. Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, 105.
- Villanueva, R., C. Nozais & S. v. Boletzky, 1995. The planktonic life of octopuses. *Nature* 377:107.
- Villanueva, R., C. Nozais & S. v. Boletzky, 1997. Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 208(1):169-184.
- Vitti, J. J., 2013. Cephalopod Cognition in an Evolutionary Context: Implications for Ethology. *Biosemiotics* 6(3):393-401.
- Walsh, L. S., P. E. Turk, J. W. Forsythe & P. G. Lee, 2002. Mariculture of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* through seven successive generations. *Aquaculture* 212(1):245-262.
- Winlow, W. & A. Di Cosmo, 2019. Editorial: Sentience, Pain, and Anesthesia in Advanced Invertebrates. *Frontiers in physiology* 10(1141).
- Winlow, W., G. Polese, H. F. Moghadam, I. A. Ahmed & A. Di Cosmo, 2018. Sense and Insensibility - An Appraisal of the Effects of Clinical Anesthetics on Gastropod and Cephalopod Molluscs as a Step to Improved Welfare of Cephalopods. *Frontiers in physiology* 9:1147.

- Wood, J. B. & D. A. Wood, 1999. Enrichment for an advanced invertebrate. *Shape* 8(3):1-5.
- Worm, B., R. Hilborn, J. K. Baum, T. A. Branch, J. S. Collie, C. Costello, M. J. Fogarty, E. A. Fulton, J. A. Hutchings, S. Jennings, O. P. Jensen, H. K. Lotze, P. M. Mace, T. R. McClanahan, C. Minto, S. R. Palumbi, A. M. Parma, D. Ricard, A. A. Rosenberg, R. Watson & D. Zeller, 2009. Rebuilding Global Fisheries. *Science* 325(5940):578-585.
- Yang, W. T., R. T. Hanlon, P. G. Lee & P. E. Turk, 1989. Design and function of closed seawater systems for culturing loliginid squids. *Aquacultural Engineering* 8(1):47-65.