

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας



Διδακτορική Διατριβή

ΘΕΜΑ

Προσδιορισμός των βιολογικών απαιτήσεων του τρίτωνα *Charonia sequezea* (Aradas & Benoit, 1870) προκειμένου να επιτευχθεί η συντήρηση υπό συνθήκες «ευζωίας» ενηλίκων ατόμων και η αναπαραγωγή.

Χρύσα Κ. Δόξα

2015

Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μ. Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

P. Divanach (Ερευνητής Α' Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας
Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών Ελληνικού
Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών)

A. Δερμών (Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Πατρών)

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Μ. Μυλωνάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Γ. Κουμουνδούρος (Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ε. Λαδουκάκης (Επ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Σ. Χατζηφώτης (Ερευνητής Β' Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας
Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών Ελληνικού
Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών)

Στην μνήμη του πατέρα μου

*Στην μητέρα μου, τον αδελφό
και την αδελφή μου*

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ενυδρείο Κρήτης του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών σε συνεργασία με το εργαστήριο Διατροφής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (Ι.ΘΑ.Β.Β.ΥΚ.) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών υπό την ευθύνη της καθηγήτριας κας Μαρουδιώς Κεντούρη και του Ερευνητή Α (Ι.ΘΑ.Β.Β.ΥΚ.) του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε και επιστημονικού υπευθύνου του Ενυδρείου Κρήτης Dr. Pascal Divanach.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Μαρουδιώ Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης) για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου από τον πρώτο κιόλας καιρό που εντάχθηκα στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Οι συζητήσεις μαζί της όλα αυτά τα χρόνια ήταν πάρα πολύ εποικοδομητικές. Θέλω να την ευχαριστήσω για την συνεχή επιστημονική της καθοδήγηση και για όλες εκείνες τις ευκαιρίες που μου προσέφερε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Dr. Pascal Divanach για την στήριξη και την πολύτιμη καθοδήγηση που προσέφερε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια. Μου έδωσε την δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα σε ένα εκπληκτικό περιβάλλον και ήταν πάντα δίπλα μου σε κάθε βήμα για να με συμβουλέψει. Η παρουσία της κας Κεντούρη και του Δρος Divanach αποτέλεσε έναν από τους κυριότερους λόγους για την αρχική μου απόφαση να ξεκινήσω το μακρύ και δύσκολο δρόμο που οδηγεί στη λήψη Διδακτορικού διπλώματος.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Πατρών κα Αικατερίνη Δερμών που συμμετείχε στην συμβουλευτική επιτροπή μου για τις παρατηρήσεις της κατά την πορεία της πραγματοποίησης αυτής της διατριβής, τις διορθώσεις επί του τελικού κειμένου και τη συνολική διάθεσή της για βοήθεια όποτε τη χρειάστηκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κο Μωησή Μυλωνά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κο Γεώργιο Κουμουνδούρο, τον Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κο Εμμανουήλ Λαδουκάκη και τον Ερευνητή Β του Ι.ΘΑ.Β.Β.ΥΚ. κο Σταύρο Χατζηφώτη για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν

συμμετέχοντας στην επιτροπή μου αλλά και για τις διορθώσεις και τα σχόλιά τους πάνω στο γραπτό κείμενο. Ευχαριστώ όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου για την εποικοδομητική συζήτηση που προέκυψε κατά τη διάρκεια της εξέτασής μου καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολο να καταφέρεις να συγκεντρώσεις τόσο πολλούς αξιόλογους επιστήμονες σε ένα χώρο και να αφιερώσουν τόσο πολύ χρόνο στη δουλειά σου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Αν. Καθ. Γιώργο Κουμουνδούρο και τον Δρ. Σταύρο Χατζηφώτη. Ο Γιώργος ήταν υπεύθυνος στο εργαστήριο της Κας Κεντούρη όταν πρωτοεντάχθηκα σε αυτό, έμαθα πάρα πολλά πράγματα δίπλα του και τον ευχαριστώ θερμά. Μαζί με την κα Κεντούρη και το Δρ Divanach διαμόρφωσαν το επιστημονικό μου υπόβαθρο. Το δε Σταύρο γιατί μέρος των πειραμάτων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό του. Τον ευχαριστώ θερμά για το χρόνο που διέθεσε και για τον εργαστηριακό εξοπλισμό που μου παρέιχε.

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή του Ενυδρείου κο Μιχάλη Παπαδάκη ο οποίος στήριξε ένθερμα αυτήν την προσπάθεια. Η συνδρομή του για την επίτευξη αυτού του στόχου ήταν πολύ μεγάλη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υπεύθυνη ενυδρειολογίας Δρ. Ασπασία Στεριώτη η οποία ήταν πάντα πρόθυμη για να μου παρέχει κάθε βοήθεια που χρειαζόμουν. Την ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο και τη συμπαράστασή της.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν δυνατή αν δεν υπήρχαν οι ερασιτέχνες αλιείς οι οποίοι συνέλεξαν τους τρίτωνες του πειραματικού μας πληθυσμού. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω θερμά τους Α. Ανδρεαδάκη, Ζ. Γρηγοράκη, Α. Λαμνίδη, Ν. Λιάπη, Γ. Μουντράκη, Α. Σιακαβάρα, Δ. Ανδρεάδη, Κ. Καισαρλή και ανώνυμους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλο το προσωπικό του Ενυδρείου Κρήτης για την ευχάριστη συνεργασία και το θερμό κλίμα που επικρατεί στον εργασιακό μας χώρο. Ιδιαίτερες ευχαριστίες χρωστάω στους συνάδελφους και φίλους του τμήματος ενυδρειολογίας και του τεχνικού τμήματος. Οι συζητήσεις μαζί τους ήταν πάντα εποικοδομητικές και η φιλία τους ανεκτίμητη. Τα παιδιά της ενυδρειολογίας, ο Θόδωρος Δουλάμης, ο Πάνος Γρηγορίου, ο Γιώργος Βαρδάνης και ο Λευτέρης Πινάκης, ήταν πάντα εκεί όταν χρειαζόμουν βοήθεια και ήταν πάντα πρόθυμοι να βοηθήσουν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Γιάννη Καλώστο, Αντώνη Παγωνάκη και Αργύρη Σαριδάκη. Η συμβολή τους για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής ήταν πολύ μεγάλη, καθώς βοήθησαν στην κατασκευή των πειραματικών

εγκαταστάσεων και στην επίλυση όλων των τεχνικών προβλημάτων που παρουσιάστηκαν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλους τους φοιτητές που κατά τη διάρκεια της πρακτικής τους άσκησης βοήθησαν ενεργά στην πειραματική διαδικασία. Ευχαριστώ τη Μαρία Κουρεπίνη, τη Μαρία Μαστοράκη, τη Rebecca Goddard και απολογούμαι σε όλους όσους ξεχνώ να αναφέρω.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Δημήτρη Σφακιανάκη από το Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις εποικοδομητικές επιστημονικές συζητήσεις που κάναμε και τις συμβουλές που απλόχερα πάντα μου προσέφερε. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Γιάννη Παπαδάκη, μαζί με τον οποίο πρωτοξεκίνησα να δουλεύω πάνω στους τρίτωνες το καλοκαίρι του 2004, όταν πραγματοποιούσα τα πειράματα της πτυχιακής μου στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών.

Ολοκληρώνοντας τον κύκλο σπουδών μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας, και ιδιαίτερα τη Μαρία Σκουλά, για όλη τη βοήθεια και υποστήριξη της- με βοηθούσε σε καθετί που ζητούσα όλα αυτά τα χρόνια- , αλλά και όλους εκείνους που μου μετέδωσαν πολύτιμες γνώσεις, με βοήθησαν, συνεργάστηκαν μαζί μου, και μου συμπαραστάθηκαν στις δύσκολες στιγμές.

Θα πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στις φίλες και συνοδοιπόρους μου Αναστασία Λάγκη και Φωτεινή Κοκού για την συμπαράστασή τους όλο αυτόν τον καιρό που είμαστε μαζί. Μπορεί να είναι και οι δύο μακριά, αλλά θα τις νιώθω πάντα κοντά μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συγγενείς μου Κώστα, Μαριάννα, το μικρό Γιωργάκη, Ζωή, Κώστα, Νατάσα, Ευτυχία, Κώστα και όλους όσους δεν θυμάμαι για την κατανόησή που δείχνουν επειδή όλον αυτό τον καιρό τους έβλεπα πολύ πιο σπάνια και την ανοχή τους για τις ώρες που τους μιλάω για τη ζωολογία και το ενυδρείο.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ, που δυστυχώς η μοίρα δεν θέλησε να διαβάσει ο πατέρας μου, το χρωστάω στην οικογένειά μου, που είναι πάντα στο πλευρό μου και με στηρίζει σε κάθε μου βήμα. Μπορεί ο πατέρας μου να μην είναι πια μαζί μας, αλλά είμαι σίγουρη ότι από εκεί που είναι συνεχίζει να φροντίζει για εμάς. Πάντα θα τον θυμάμαι με αγάπη και νοσταλγία και θα του είμαι ευγνώμον για όλα όσα πρόσφερε σε μένα και στα αδέρφια μου. Ευχαριστώ πολύ την Μητέρα μου Δέσποινα

και τα αδελφια μου Γιώργο και Ιωάννα για όλη την υποστήριξη, την κατανόηση και την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια. Θέλω να ξέρουν ότι τους αγαπώ πολύ!

Σας ευχαριστώ πολύ!!!!

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Τα γαστερόποδα του γένους <i>Charonia</i> (Gistel, 1847).....	1
1.2. Μορφολογία κελύφους και γεωγραφική εξάπλωση.....	2
1.3. Οικολογία.....	3
1.4. Εκτροφή για οικολογική αποκατάσταση και διατήρηση.....	5
1.5. Σκοπός.....	7
2. Προσδιορισμός ποιοτικών και ποσοτικών διατροφικών απαιτήσεων των ενήλικων ατόμων/γεννητόρων του είδους <i>Charonia sequeenzae</i> υπό τρεις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες.....	9
2.1. Διατροφική συμπεριφορά και προσαρμογή απέναντι σε φυσικά θηράματα και εναλλακτικές τροφές.....	10
2.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
2.1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	12
2.1.2.1. Πειραματικός πληθυσμός.....	12
2.1.2.2. Πειραματικές τροφές.....	13
2.1.2.3. Πειραματική διαδικασία.....	13
2.1.2.4. Στατιστική ανάλυση.....	14
2.1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	15
2.1.3.1. Πρότυπο αντίδρασης στην παρουσία τροφής.....	15
2.1.3.2. Ποσοστό αποδοχής.....	16
2.1.3.3. Δυναμική απόκρισης στην τροφή.....	17
2.1.3.4. Κατανάλωση τροφής.....	19
2.1.3.5. Ιστοειδική επιλεκτικότητα.....	20
2.1.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	22
2.2. Διατροφικές προτιμήσεις υπό συνθήκες εκτροφής.....	25
2.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	25
2.2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.2.2.1. Κατά προσέγγιση βιοχημική ανάλυση τροφών.....	28
2.2.2.2. Πειραματικές τροφές.....	30
2.1.1.3. Πειραματική διαδικασία.....	31

2.1.1.4. Στατιστική ανάλυση.....	33
2.2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
2.2.3.1. Βιοχημική σύσταση τροφών.....	34
2.2.3.2. Επιλογή τροφής.....	35
2.2.3.3. Κατανάλωση τροφής.....	37
2.2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ποσότητα τροφής που	
καταναλώνεται.....	43
2.3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	43
2.3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
2.3.2.1. Πειραματικές τροφές.....	45
2.3.2.2. Πειραματική διαδικασία.....	45
2.3.2.3. Στατιστική ανάλυση.....	46
2.3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
2.3.3.1. Κατανάλωση τροφής.....	47
2.3.3.2. Αύξηση.....	48
2.3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
Ημερονύκτια δραστηριότητα και θήρευση του τρίτωνα <i>Charonia</i>	
<i>seguenzae</i>.....	53
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	53
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
3.1.1. Πειραματική διαδικασία.....	55
3.1.2. Ανάλυση καταγραφών.....	55
3.1.3. Στατιστική ανάλυση.....	56
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
3.2.1. Θήρευση.....	58
3.2.2. Ημερονύκτια δραστηριότητα.....	60
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
Πρότυπο αναπαραγωγής του τρίτωνα <i>Charonia seguenzae</i> σε συνθήκες	
αιχμαλωσίας.....	67
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	67
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	70
4.1.1. Μελέτη αναπαραγωγικής συμπεριφοράς.....	70
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71

4.2.1. Γονιμοποίηση.....	71
4.2.2. Εναπόθεση εμβρυικών σάκων και μητρική συμπεριφορά.....	73
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
Επίδραση της θερμοκρασίας και του μεγέθους της μητέρας στην γονιμότητα και την εμβρυική ανάπτυξη.....	85
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	85
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	88
5.1.1. Βιοχημική ανάλυση σάκων.....	88
5.1.2. Επίδραση του μεγέθους της μητέρας και της θερμοκρασίας στη γονιμότητα.....	88
5.1.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην εμβρυική ανάπτυξη.....	89
5.1.4. Στατιστική ανάλυση.....	90
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	91
5.2.1. Εμβρυικοί σάκοι.....	91
5.2.2. Επίδραση του μεγέθους της μητέρας στη γονιμότητα.....	92
5.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στη γονιμότητα.....	96
5.2.4. Εμβρυική ανάπτυξη.....	97
5.2.5. Επίδραση της θερμοκρασίας στην εμβρυική ανάπτυξη.....	98
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	102
Συμπεράσματα.....	108
Βιβλιογραφία.....	112
Περίληψη.....	137
Abstract.....	139

1. Εισαγωγή

1.1 Τα γαστερόποδα του γένους *Charonia* (Gistel, 1847)

Τα προσοβράγχια γαστερόποδα του γένους *Charonia*, ή αλλιώς Τρίτωνες, είναι από τους μεγαλύτερους και ομορφότερους θαλάσσιους θηρευτές των τροπικών και εύκρατων περιοχών. Το όνομα Τρίτωνας οφείλεται σε έναν από τους θεούς των αρχαίων Ελλήνων, τον Τρίτωνα, γιο του Ποσειδώνα, θεού της θάλασσας. Τα είδη που ανήκουν στο γένος *Charonia* έχουν χρησιμοποιηθεί σαν σκεύη και μουσικά όργανα από παράκτιους και νησιωτικούς λαούς όπου και όποτε το γένος ήταν παρόν, και συγκαταλέγονται στα πιο οικεία για τον άνθρωπο μαλάκια. Σε μια αρχική προσπάθεια περιγραφής του γένους, ο A.G. Beu (1970) κατέληξε στο ότι όλα τα ονόματα για τις μορφές στο γένος μειώνονται σε επτά γεωγραφικά υποείδη δυο ειδών, του *Charonia tritonis* (Linnaeus, 1758) που απαντά σε ζεστά εύκρατα και τροπικά νερά και του *Charonia lampas* (Linnaeus, 1758) που απαντά σε πιο κρύα υποτροπικά νερά και στα δύο ημισφαίρια. Τα δυο υποείδη του *Charonia tritonis* αν και φέρουν πολλές μορφολογικές ομοιότητες είναι γεωγραφικά διαχωρισμένα. Το *Charonia tritonis tritonis* απαντά στον Ινδικό και Ειρηνικό Ωκεανό, ενώ το *Charonia tritonis variegata* στον Ατλαντικό Ωκεανό και στη Μεσόγειο θάλασσα (Beu, 1970). Τα υποείδη του *Charonia lampas* εμφανίζουν διαφορές στο μέγεθος των εξογκωμάτων του κελύφους, την πρώιμη αρχιτεκτονική της σπείρας, το πάχος των οδοντώσεων που φέρει το εσωτερικό χείλος και το πάχος και τον αριθμό των ενδιάμεσων σπειρωμάτων. Τρία από τα υποείδη, τα *C. lampas lampas*, *C. lampas sauliae* και *C. lampas carax* είναι πολύ όμοια σε όλα τα χαρακτηριστικά και είναι δύσκολο να τα ξεχωρίσει κανείς αν εξετάσει λίγα άτομα. Διαφέρουν μόνο στις λεπτομέρειες του ενδόστυλου και στην αρχιτεκτονική της πρώιμης σπείρας. Τα άλλα δυο υποείδη, το *C. lampas rubicunda* και το *C. lampas pustulata*, μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους παρά με τα τρία άλλα υποείδη, αλλά διαχωρίζονται εύκολα από το πάχος της δευτερογενούς αρχιτεκτονικής της σπείρας, το μέγεθος και το χρώμα.

Το 2010 ο Beu, μετά από χρόνια μελέτης και εμπειρίας απέρριψε την θεωρία των υποειδών και κατέληξε στην ύπαρξη τεσσάρων ειδών (Εικ. 1). Σύμφωνα με τα νέα στοιχεία που παρουσιάζει τα άτομα του είδους *C. lampas* εμφανίζουν διακριτές

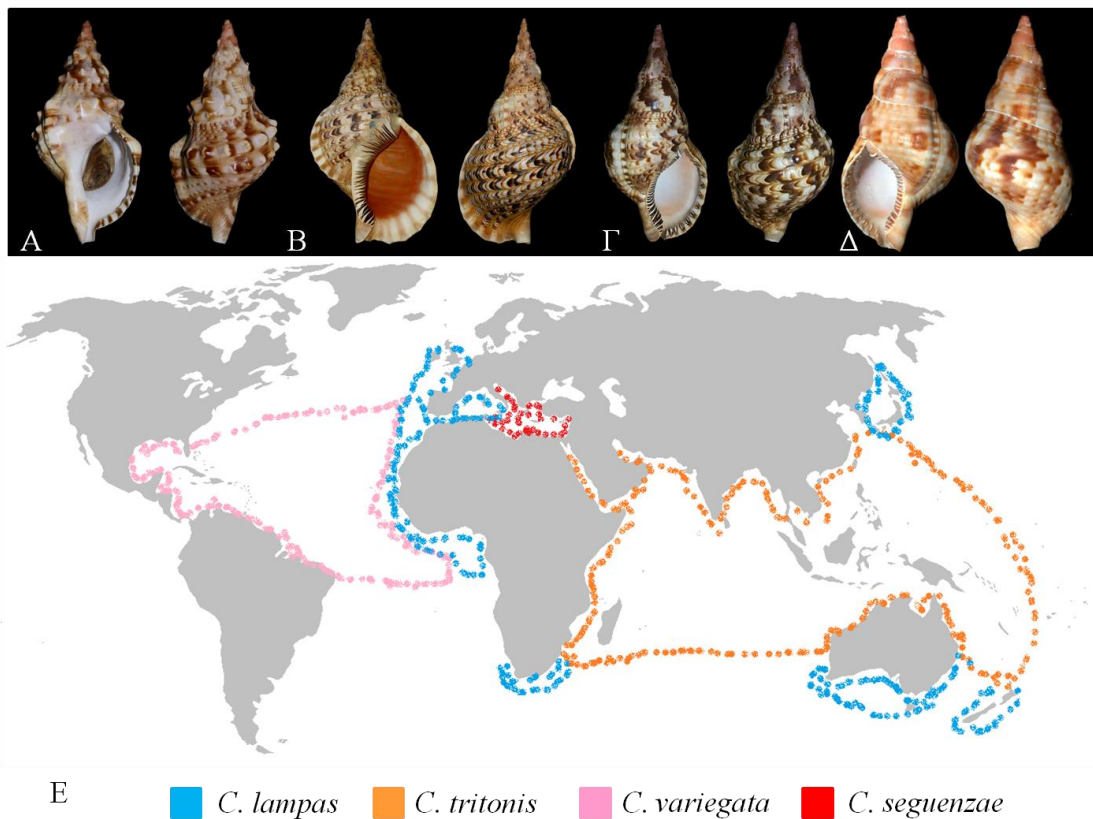
μορφολογικές διαφορές - ανάλογα με το υποείδος στο οποίο ανήκαν - οι οποίες όμως περιορίζονται μόνο στα άτομα που απαντούν στην παλιρροιακή ζώνη. Οι διαφορές των ατόμων που συλλέγονται από βάθη μεγαλύτερα των 50m είναι αρκετά δυσδιάκριτες σε οποιοδήποτε μέρος του κόσμου. Οπότε ο Beu (2010) καταλήγει στην ύπαρξη ενός και μόνο είδους με ευρεία κατανομή, εκτός και αν αποδειχθεί η ύπαρξη διακριτών γεωγραφικών υποειδών με τη χρήση μοριακών εργαλείων. Από την άλλη, αναφέρει ότι τα δυο υποείδη του *C. tritonis* (*C. tritonis tritonis* και *C. tritonis variegata*) είναι διακριτά είδη, το *C. tritonis* (Linnaeus, 1758), που απαντά στον Ινδοειρηνικό ωκεανό, και το *C. variegata* (Lamarck, 1816), που απαντά στον Ατλαντικό. Εκτός όμως από αυτό, εικάζει ότι οι πληθυσμοί που είναι απομονωμένοι στην Ανατολική Μεσόγειο για μεγάλο χρονικό διάστημα, μάλλον ως αποτέλεσμα της κρίσης αλατότητας της Μεσογείου κατά το Μεσσήνιο, δεν ανήκουν στο ίδιο είδος με το *C. variegata*, αλλά είναι ένα διακριτό είδος, το *C. seguenzae* (Aradas & Benoit, 1870). Το *C. seguenzae* αντικαθιστά το *C. lampas* στην Ανατολική Μεσόγειο με το οποίο συνυπάρχει μόνο στα στενά της Σικελίας και στη Μάλτα (Russo *et al.*, 1990). Σύμφωνα με τον Beu (2010) τα άτομα της Ανατολικής Μεσογείου διαφέρουν από αυτά του Ατλαντικού, διότι έχουν ένα σημαντικά ψηλότερο, στενότερο και λιγότερο ανάγλυφο κέλυφος με έντονο, καστανοκόκκινο χρωματισμό σε σύγκριση με το ανοιχτόχρωμο κόκκινο που χαρακτηρίζει το *C. variegata*.

1.2 Μορφολογία κελύφους και γεωγραφική εξάπλωση

Τα άτομα του είδους *Charonia seguenzae* γίνονται πολύ μεγάλα σε μέγεθος, φθάνοντας τα 307,7 mm (Beu, 2010). Η σπείρα και γενικότερα το κέλυφος είναι λεπτό και μακρύ. Το εξωτερικό χείλος φέρει χρωματικές εναλλαγές. Στο εσωτερικό χείλος υπάρχουν εμφανείς λευκές ραβδώσεις πάνω σε ένα σκούρο καφέ φόντο που απλώνονται σε όλο του το μήκος του. Στο εσωτερικό μέρος του εξωτερικού χείλους υπάρχουν ζεύγη ή τριπλέτες καφέ οδοντώσεων σε ανοιχτόχρωμο φόντο (Εικ. 1). Η σπείρα αποτελείται από ευρείες χορδές με μια μόνο στενή γραμμή να γεμίζει τα μεσοδιαστήματα, ενώ τα εξογκώματα είναι πολύ μικρά ή δεν υπάρχουν καθόλου. Η επιφάνεια του κελύφους είναι πολύ γυαλιστερή και σχεδόν δεν υπάρχει καθόλου περίστρακο. Το χρωματικό πρότυπο είναι πολύ φωτεινό και χαρακτηρίζεται από μια εναλλαγή αντιθέσεων μεταξύ κοκκινο-καφέ κηλίδων σε σχήμα ημισελήνου πάνω σε μπλε-κρεμ φόντο.

Το σώμα του ζώου, όπως σε όλα τα γαστερόποδα, αποτελείται από το κεφάλι, τον πόδα και τη σπλαχνική μάζα. Το κεφάλι φέρει ένα ζεύγος κιτρινόμαυρων ριγέ κεραιών στην βάση των οποίων είναι τοποθετημένοι οι οφθαλμοί. Το χρώμα του ζώου είναι μπεζ-κίτρινο με πιο σκούρες καφέ κηλίδες.

Το *C. seguenzae* είναι απομονωμένο στην Ανατολική Μεσόγειο και συνυπάρχει με το *C. lampas* μόνο στα στενά της Σικελίας και στη Μάλτα (Russo *et al.*, 1990). Σύμφωνα με τον Beu (2010) τα άτομα της Ανατολικής Μεσογείου διαφέρουν από αυτά του Ατλαντικού, διότι έχουν ένα σημαντικά ψηλότερο, στενότερο και λιγότερο ανάγλυφο κέλυφος με έντονο, καστανοκόκκινο χρωματισμό σε σύγκριση με το ανοιχτόχρωμο κόκκινο που χαρακτηρίζει το *C. variegata*.



Εικ. 1: Μορφολογία κελύφους και γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του γένους *Charonia* σύμφωνα με τον Beu (2010). Α) *C. lampas*, Β) *C. tritonis*, Γ) *C. variegata*, Δ) *C. seguenzae*, Ε) Γεωγραφική εξάπλωση.

1.3 Οικολογία

Οι αναφορές για το ενδιαίτημα στο οποίο απαντούν οι τρίτωνες αφορούν στα είδη *C. variegata* (Percharde, 1972) και *C. lampas* (Russo *et al.*, 1990). Σύμφωνα με

τους Russo *et al.*(1990), οι δύτες βλέπουν τους τρίτωνες του είδους *C. lampas* κατά τη διάρκεια της ημέρας σε σκληρά υποστρώματα όπου συχνάζουν σκιοφίλες κοινότητες κοραλλινών και προκοραλλινών, ενώ από την άλλη, οι ψαράδες τους πιάνουν κυρίως τη νύχτα σε μαλακά υποστρώματα. Εικάζουν λοιπόν ότι το ενδιαίτημα που προτιμούν είναι αυτό που χαρακτηρίζεται από εναλλαγή σκληρού και μαλακού υποστρώματος, όπως τα όρια βραχωδών περιοχών με αμμώδεις περιοχές. Σύμφωνα με τον Percharde (1972), ο οποίος πραγματοποίησε σειρά καταγραφών ζώων στο φυσικό τους περιβάλλον στην περιοχή του Trinidad και του Tobago, το *C. variegata* εμφανίζει διμορφισμό, ανάλογα με το βάθος. Χωρίζει τα άτομα σε αυτά των ρηχών νερών, στις κοραλλιογενείς υφάλους που χαρακτηρίζονται από εντονότερα ασβεστοποιημένο και πιο ανοιχτόχρωμο κέλυφος, πάνω στο οποίο αναπτύσσονται άλγη και πολλές φορές σπόγγοι που ανήκουν στο γένος *Cliona*. Η μορφή που απαντά στα πιο βαθιά νερά, 15 με 45 μέτρα από την επιφάνεια, ζει σε αμμώδη-λασπώδη βυθό όπου υπάρχουν περιστασιακά βράχια, στα οποία βρίσκουν καταφύγιο τα ζώα όταν ξεκουράζονται. Στην εν λόγω μελέτη τα περισσότερα άτομα που παρατηρήθηκαν βρέθηκαν μέσα σε μικρές κοιλότητες και εσοχές που σχηματίζουν οι βράχοι, ή πάνω σε αμμώδη πυθμένα ο οποίος βρίσκεται στις παρυφές κάποιου βράχου.

Αυτό το εναλλασσόμενο ενδιαίτημα που περιγράφεται και από τους Russo *et al.* (1990) και από τον Percharde (1972) ταιριάζει με την γνωστή μέχρι σήμερα διατροφική προτίμηση του υποείδους. Σύμφωνα με την σύνοψη για τους Μεσογειακούς Τρίτωνες των Russo *et al.* (1990), το αγαπημένο τους θήραμα είναι ο αστερίας *Echinaster sepositus*, ο οποίος απαντά σε μεγάλη αφθονία σχεδόν σε όλη τη Μεσόγειο. Οι αστερίες τρέφονται με διάφορα είδη σπόγγων (*Axinella sp.*, *Leucandra sp.*, κλπ), οι οποίοι χαρακτηρίζουν σκιοφίλες κοινότητες («προκοραλλίνες» και «κοραλλίνες») σε βραχώδεις περιοχές. Αναφέρεται επίσης, ότι ελλείπει του εχινόδερμου *Echinaster sepositus*, οι τρίτωνες τρέφονται με ποικίλα Μεσογειακά εχινόδερμα σκληρών (κυρίως αστερίες όπως ο *Ophidiaster ophidianus*, *Coscinasterias tenuispina*, *Marthasterias glacialis*, και αχινόι όπως ο *Paracentrotus lividus*) ή μαλακών υποστρωμάτων (κυρίως αστερίες όπως ο *Astropecten aranciacus*) και ολοθούρια όπως το *Holothuria forskali*). Η πτωματοφαγία δεν μπορεί να εξαιρεθεί, μιας και έχουν βρεθεί κάποια άτομα πάνω σε υπολείμματα από ψάρια, και σε ενυδρεία έχουν ταϊστεί με υπολείμματα από ψάρι, καρκινοειδή και μαλάκια. Ο Percharde (1972) αναφέρει ότι στο διαιτολόγιο του *Charonia variegata* στο Trinidad

και Tobago περιλαμβάνονται τα εχινόδερμα *Echinaster sentus*, *Eusidaris tribuloides*, *Tripneustes sp.*, *Synapta sp.*, *Cucumaria sp.*, τα μαλάκια *Laevicardium laevigatum*, *Chione cancellata*, *Fasciolaria tulipa*, *Cypraea zebra*, ενώ γίνεται αναφορά σε δυο περιπτώσεις κατανάλωσης των δεκάποδων καρκινοειδών *Panulirus argus* και *Panulirus guttatus*. Οι Russo *et al.* (1990) κατέληξαν στην υπόθεση ότι οι Τρίτωνες αφήνουν το βραχώδες καταφύγιο τους και βγαίνουν είτε σε αμμώδες-λασπώδες είτε σε βραχώδες υπόστρωμα για να κυνηγήσουν την τροφή τους.

1.4 Εκτροφή για οικολογική αποκατάσταση και διατήρηση

Τα γαστερόποδα του γένους *Charonia* είναι πλέον πολύ σπάνια και σε αρκετές περιπτώσεις έχουν εξαφανιστεί από συγκεκριμένες περιοχές λόγω της υπεραλίευσης για την κατανάλωση της σάρκας του ή για την πώληση ως διακοσμητικό αντικείμενο (Russo *et al.*, 1990, Hosking, 1996, Wang, 1997, McLean, 1999, Kang & Kim, 2004, Katsanevakis *et al.*, 2008). Στη Μεσόγειο υπάρχουν δυο αλλοπάτρια είδη, το *C. lampas* στην Δυτική και το *C. seguenzae* στην Ανατολική. Παρά το ότι δεν συμπεριλαμβάνονται στο κόκκινο βιβλίο (IUCN, 2012) και τα δύο είδη προστατεύονται σύμφωνα με το Παράρτημα II της σύμβασης της Βέρνης (Council of Europe, 1979) και από το Πρωτόκολλο της Βαρκελώνης (European Community, 1999). Παρ' όλα αυτά, εξακολουθούν να αλιεύονται, είτε σκοπίμως είτε τυχαία, και τα παρεμπίπτοντα αλιευμένα άτομα σπάνια απελευθερώνονται στο φυσικό περιβάλλον.

Οι τρίτωνες, και ειδικότερα τα άτομα του είδους *Charonia tritonis*, αποτελούν έναν από τους πλέον ενδιαφέροντες θαλάσσιους θηρευτές, καθώς η καταστροφή πολλών κοραλλιογενών υφάλων από αστερίες είναι άμεσα συνδεδεμένη με την υπεραλίευση τους (Endean 1977). Συμβάλλουν στην προστασία των κοραλλιογενών υφάλων, καθώς αποτελούν κύριο θηρευτή του κοραλλιοφάγου αστερία *Acanthaster planci* (Linnaeus, 1758), ο οποίος έχει προκαλέσει τεράστια καταστροφή σε πολλούς κοραλλιογενείς υφάλους στον Ινδοειρηνικό ωκεανό τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες (Birkeland & Lucas, 1990, Bordie *et al.* 2005). Για την εξήγηση της έξαρσης των πληθυσμών του *A. planci* έχουν προταθεί δυο θεωρίες. Η πρώτη (Vine, 1973, Potts, 1981) υποστηρίζει ότι πρόκειται για ένα φυσικό φαινόμενο. Η δεύτερη, υποστηρίζει ότι οι εξάρσεις αυτές οφείλονται σε ανθρωπογενείς παράγοντες. Ο σημαντικότερος ίσως είναι η αφαίρεση των ενήλικων θηρευτών από το περιβάλλον λόγω της

οικονομικής τους εκμετάλλευση (Endean, 1977), όμως ο μόνος θηρευτής του *A. planci* που υφίσταται οικονομική εκμετάλλευση είναι το *Charonia tritonis* (Bordie *et al.*, 2005). Έτσι, αν ισχύει η δεύτερη υπόθεση, η ελεγχόμενη απελευθέρωση εκτρεφόμενων ατόμων στο φυσικό περιβάλλον, αλλά και η αποτροπή της παράνομης αλίευσης λόγω διάθεσης στην αγορά εκτρεφόμενων ατόμων, θα συμβάλει στην διατήρηση της βιοποικιλότητας στις εύκρατες και τροπικές περιοχές (Plusty, 2002, Pomeroy *et al.*, 2006).

Πέρα των αυστηρά οικολογικών λόγων που καθιστούν αναγκαία την εκτροφή τριτώνων σε συνθήκες αιχμαλωσίας για τη διατήρηση της βιολογικής ποικιλότητας, η επιτυχημένη εκτροφή του εν λόγω είδους θα μπορούσε να έχει και οικονομικά οφέλη. Οι τρίτωνες είναι ένα είδος με μεγάλη εμπορική αξία, για τη σάρκα τους, η οποία αποτελεί μέρος της διατροφής των χωρών της Άπω Ανατολής (Hosking, 1996, Kang & Kim, 2004), ή για τα κελύφη τους που χρησιμοποιούνται ανά τον κόσμο για διακοσμητικούς ή/και άλλους σκοπούς. Η χρήση των κελυφών σε διάφορες εποχές και περιοχές ως μουσικό όργανο είναι γνωστή (Wang, 1997, McLean, 1999). Η αλίευση για πώληση των κελυφών των τριτώνων του Ινδοειρηνικού ωκεανού έχει οδηγήσει σε τρομερή μείωση των εκεί πληθυσμών (Endean, 1977), ενώ είναι γνωστό ότι αλιεύεται με σκοπό την πώληση του κελύφους του και στην Μεσόγειο. Η εισαγωγή του είδους στις υδατοκαλλιέργειες και η ελεγχόμενη παραγωγή του θα μπορούσε να μειώσει ή και να αποτρέψει την υπεραλίευσή του, βοηθώντας στην διατήρηση των φυσικών πληθυσμών του. Πρόσφατα επίσης, οι Kang & Kim (2004) πρότειναν τη χρήση των μαλακίων του γένους *Charonia* λόγω των ιδιαίτερων διατροφικών τους συνηθειών για την προστασία των οστρακοκαλλιιεργειών από τους αστερίες. Ένας ακόμα τομέας στον οποίο θα μπορούσε να συνδράμει η εκτροφή των τριτώνων είναι η χρήση τους στην βιομηχανία φαρμάκων, καθώς όπως αναφέρει ο Shiu (2003), στον αδένα του μεσεντέρου τους περιέχεται τετροδοτοξίνη, ή παράγωγά της. Η τετροδοτοξίνη είναι ένας εξειδικευμένος αναστολέας Na^+ που ερευνάται ως ένα πιθανό αναλγητικό για τον πόνο που σχετίζεται με τον καρκίνο (Hagen *et al.*, 2008). Μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα έδειξαν ότι η τετροδοτοξίνη έχει ισχυρή αναλγητική δράση (Omana-Zapata *et al.*, 1997, Lyu *et al.*, 2000, Marcil *et al.*, 2006). Κανάλια Νατρίου υπάρχουν στις περισσότερες ίνες αλγαισθητικού πόνου (nociceptive pain fibers) και ο μηχανισμός με τον οποίο η τετροδοτοξίνη επιτυγχάνει την αναλγητική της δράση πιστεύεται ότι σχετίζεται με την ιδιότητά της να αναστέλλει τα κανάλια νατρίου αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί

(Hagen *et al.*, 2008). Πρώιμες κλινικές δοκιμές καταδεικνύουν σημαντική ανακούφιση από τον πόνο σε μερικούς ασθενείς (Nieto *et al.*, 2012).

Η υδατοκαλλιέργεια θεωρείται ευρέως ως η πιθανή εναλλακτική μέθοδος για τη διατήρηση και αποκατάσταση απειλούμενων ειδών (Plusty, 2002, Pomeroy *et al.*, 2006). Παρέχει τη δυνατότητα εκτροφής ειδών εξ ολοκλήρου σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Αυτή είναι η βάση για τα προγράμματα επιβίωσης ειδών (species survival programs). Τα προγράμματα επιβίωσης ειδών επικεντρώνονται σε είδη που κινδυνεύουν με εξαφάνιση στη φύση και η μόνη ελπίδα επιβίωσης του είδους βρίσκεται στην επίτευξη αναπαραγωγής σε συνθήκες αιχμαλωσίας σε ζωολογικούς κήπους και ενυδρεία. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 28 είδη ψαριών κιχλίδων του γένους *Haplochromine* σε καθεστώς διαχείρισης μέσω του προγράμματος επιβίωσης ειδών της Αμερικανικής Ένωσης Ζωολόγων (AZA, 1996). Αν και η παραγωγή κιχλίδων δεν είναι εντατική, δεν παύει να ακολουθεί τις βασικές αρχές της παραγωγής που απαντά στις υδατοκαλλιέργειες. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να μη συμβάλλει μόνο στην διατήρηση ενός απειλούμενου είδους όπως το *Charonia sequeenzae* αλλά θα επιτρέψει και στους ερευνητές να συγκεντρώσουν πολύτιμες πληροφορίες για τη ζωή του (ηλικία ωρίμανσης, γονιμότητα κ.α.) που θα βοηθήσουν στην βελτίωση της διαχείρισης των φυσικών αποθεμάτων και στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι οργανισμοί αυτοί αποκρίνονται στις αλλαγές που προκαλούνται από διάφορους παράγοντες (περιβαλλοντικούς και ανθρωπογενείς). Η εφαρμογή της γνώσης που θα αποκομισθεί από τη μελέτη του *Charonia sequeenzae* και σε άλλα είδη το γένους *Charonia* μπορεί να βοηθήσει συνολικά στην διατήρηση ενός έντονα καταπιεσμένου γένους τα είδη του οποίου απειλούνται παγκοσμίως.

1.5 Σκοπός

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι βιολογικές απαιτήσεις του τρίωνα, *Charonia sequeenzae* προκειμένου να επιτευχθεί η συντήρηση υπό συνθήκες ευζωίας (welfare) ενήλικων ατόμων και η αναπαραγωγή τους. Οι στόχοι ομαδοποιούνται σε τρεις δράσεις. Η πρώτη δράση ασχολείται με την διατροφή και ειδικότερα (α) με τη συμπεριφορά διατροφής και τον προσδιορισμό του φάσματος τροφής που δύνανται να καταναλώσουν οι τρίωνες, (β) με την προτίμηση και (γ) με τον προσδιορισμό των διατροφικών απαιτήσεων (ποσοτικών και ποιοτικών) υπό τρεις θερμοκρασίες (17, 20, 23°C). Η δεύτερη δράση εξετάζει την ημερονύκτια

δραστηριότητα σε σχέση με τη θήρευση και στην τρίτη μελετήθηκε η αναπαραγωγή των ενήλικων ατόμων και ειδικότερα (α) ο προσδιορισμός της καταλληλότερης θερμοκρασίας και η περιγραφή του προτύπου αναπαραγωγής των τριτώνων και (β) η μελέτη του εμβρυικού σταδίου.

2. Προσδιορισμός ποιοτικών και ποσοτικών διατροφικών απαιτήσεων των ενήλικων ατόμων/γεννητόρων του είδους *Charonia seguenzae* υπό τρεις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες.

Η αποκατάσταση των φυσικών πληθυσμών των γαστερόποδων του γένους *Charonia* στις διαταραγμένες περιοχές απαιτεί εκτενή γνώση της βιολογίας και της οικολογίας του, καθώς και πληροφορίες για τη διατήρηση και την εκτροφή σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Οι αναφορές που υπάρχουν για το *Charonia seguenzae* είναι πολύ περιορισμένες και αφορούν στη γεωγραφική του εξάπλωση (Clench & Turner, 1957), τη συστηματική και την εξωτερική του μορφολογία (Beu, 1970, 2010). Συμπληρωματική βιβλιογραφία για άλλα είδη του γένους *Charonia* παρέχουν κάποια βιοχημικά και φαρμακολογικά δεδομένα (Hatanaka *et al.*, 1975a,b, 1976a,b, Teshima *et al.*, 1979, Butters *et al.*, 1991), καθώς και κάποια στοιχεία που αφορούν στην συμπεριφορά διατροφής (Laxton, 1971, Nugranad *et al.*, 2000, Kang & Kim, 2004, Morton, 2012) και την αναπαραγωγή τους (Laxton, 1969, Berg, 1971, Nugranad *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2013).

Η διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει όλες τις φυσιολογικές διεργασίες σε όλα τα στάδια της ζωής ενός ζώου, συνδέεται με την «ευεξία» του σε συνθήκες αιχμαλωσίας και έχει ως στόχο την παροχή θρεπτικών ουσιών οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για την αναπαραγωγή, την αύξηση, την συντήρηση και την κίνηση του οργανισμού. Οι ουσίες αυτές σε κυτταρικό επίπεδο εξασφαλίζουν το νερό, τα «καύσιμα», τα δομικά συστατικά και ρυθμίζουν τον μεταβολισμό του ζώου. Τα θρεπτικά συστατικά χωρίζονται σε έξι κατηγορίες: νερό, πρωτεΐνες (και αμινοξέα), λίπη, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Η ενέργεια παρέχεται από την τροφή μέσω της καύσης των λιπών, των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών. Ο προσδιορισμός των διατροφικών απαιτήσεων των τριτόνων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον αφού η τροφή είναι η σημαντικότερη πρώτη ύλη για την ανάπτυξή τους, τόσο για την δημιουργία των σωματικών ιστών όσο και του κελύφους τους.

2.1 Διατροφική συμπεριφορά και προσαρμογή απέναντι σε φυσικά θηράματα και εναλλακτικές τροφές.

2.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ανάμεσα στους τρίτωνες το πιο γνωστό είδος είναι το *Charonia tritonis* που, στον Μεγάλο Κοραλλιογενή Ύφαλο στην Αυστραλία, τρέφεται με τους αστερίες *Acanthaster planci* και *Linckia laevigata* (Chesher, 1969). Οι Endean & Stablum (1973) αναφέρουν ότι από τα πέντε άτομα *C. tritonis* που παρατηρήθηκαν καθώς έτρωγαν σε νησιά του Μεγάλου Κοραλλιογενή Υφάλου, τέσσερα είχαν επιτεθεί σε νεαρά άτομα *A. planci*, διαμέτρου μόλις 20 mm, ενώ ένα άλλο τρεφόταν με ολοθούρια. Ο Thomassin (1976) αναφέρει ότι το *C. tritonis* τρέφεται με τον αστερία *Protoreaster nodosus* και οι Nugranad *et al.* (2000) ότι σε συνθήκες αιχμαλωσίας, στην Ταϊλάνδη, το *C. tritonis* τρέφεται με τους αστερίες *A. planci* και *Culcita novaeguineae* και τα ολοθούρια *Holothuria atra* και *Stichopus chloronotus*.

Σε εργαστηριακά πειράματα στην Νότια Κορέα (Kang & Kim, 2004), μελετήθηκε η ικανότητα θήρευσης του Τρίωνα του Βορειοδυτικού Ειρηνικού *Charonia sp.* [ο Morton 2012, πιθανολογεί ότι πρόκειται για το *C. sauliae* (Reeve, 1844) = *C. lampas* (Bouchet *et al.* 2010)] έναντι διάφορων ασπόνδυλων θηραμάτων. Τα θηράματα που μελετήθηκαν ήταν οι αστερίες *Asterina pectinifera* και *Asterias amurensis*, το αυτί της θάλασσας *Haliotis discus hannai*, τα δίθυρα *Anadara broughtonii* και *Tapes philippinarum*, και οι αχινοί *Hemicentrotus pulcherrimus* και *Anthocidaris crassispina*. Από αυτά, τα μόνα που δεν καταναλώθηκαν ήταν τα μαλάκια.

Ο Percharde (1972) αναφέρει ότι στο Trinidad στην Καραϊβική, το *C. variegata* εκτός από αστερίες (*Echinaster sentus*), τρέφεται και με αχινούς (*Eucidaris tribuloides* και *Tripneustes sp.*), ολοθούρια (*Synapta sp.* και *Cucumaria sp.*), δίθυρα (*Laevicardium laevigatum* και *Chione cancellata*), γαστερόποδα (*Fasciolaria tulipa* και *Cypraea zebra*) και αν και σπάνια και με τους αστακούς *Panulirus argus* και *Panulirus guttatus*.

Τα είδη της Νέας Ζηλανδίας, *Charonia carax* και *Charonia rubicunda* που πρόσφατα ο Beu (2010) αναγνωρίζει σαν ένα είδος, το *C. lampas* (Linnaeus, 1758),

τρέφονται κυρίως με τα εχινόδερμα με την μεγαλύτερη αφθονία στην περιοχή που ζουν. Σε πειραματικές συνθήκες φαίνεται να προτιμούν τους αστερίες *Patiriella regularis* και *Coscinasterias calamaria* (Laxton 1971). Στις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού, στο St Jean-de-Luz, ο Kisch (1949,1952) αναφέρει ότι το *Charonia lampas* τρέφεται με ολοθούρια (*Holothuria forskalli*) και αχινούς (*Paracentrotus lividus*). Σύμφωνα με την σύνοψη για τους Μεσογειακούς Τρίτωνες των Russo *et al.* (1990), το αγαπημένο τους θήραμα είναι ο αστερίας *Echinaster sepositus*, ο οποίος απαντά σε μεγάλη αφθονία σχεδόν σε όλη τη Μεσόγειο. Ελλείπει *Echinaster sepositus*, οι τρίτωνες τρέφονται με ποικίλα Μεσογειακά εχινόδερμα (αστερίες *Ophidiaster ophidianus*, *Coscinasterias tenuispina*, *Marthasterias glacialis*, και *Astropecten aranciacus*, αχινούς *Paracentrotus lividus* και ολοθούρια *Holothuria forskalli*).

Η συμπεριφορά θήρευσης έχει περιγραφεί μόνο από τον Morton (2012) και αφορά ένα άτομο *C. lampas* από το Sao Miguel (Azores). Το εν λόγω άτομο συλλέχθηκε από το περιβάλλον και παρατηρήθηκε η συμπεριφορά θήρευσης και ταΐσματος έναντι ενός ατόμου αστερία *Ophidiaster ophidianus* σε εργαστηριακές συνθήκες.

Ελλείπει δεδομένων για το *C. seguenzae*, οι Russo *et al.* (1990) υπέθεσαν ότι παρουσιάζει ομοιότητες ως προς τον τρόπο ζωής με το Μεσογειακό *C. lampas*. Θεώρησαν λοιπόν ότι στη φύση, το *C. seguenzae* είναι επιλεκτικός θηρευτής και ότι η διατροφή του στηρίζεται στα εχινόδερμα (Russo *et al.*, 1990), με έντονη προτίμηση για τους αστερίες (Doxa *et al.*, 2006). Στόχος του πρώτου μέρους της παρούσας ενότητας είναι η περιγραφή της διατροφικής συμπεριφοράς του *C. seguenzae* και ο προσδιορισμός του φάσματος φυσικών θηραμάτων και εναλλακτικών τροφών που δύναται να καταναλώσει σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

2.1.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.2.1 Πειραματικός πληθυσμός

150 άτομα *Charonia sequezea* συλλέχθηκαν από καταδύσεις και ψάρεμα με δίχτυα που πραγματοποιήθηκαν στις βόρειες και νότιες ακτές της Κρήτης την περίοδο 2001-2009. Μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του Ενυδρείου Κρήτης του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., στις Γούρνες Ηρακλείου όπου τοποθετήθηκαν σε ομάδες 5-10 ατόμων σε ενυδρεία 150 και 300L τροφοδοτούμενα από φιλτραρισμένο, ημίκλειστο σύστημα νερού (ανανέωση 30%/h, ανακύκλωση 100%/h). Η θερμοκρασία ρυθμιζόταν στην επιθυμητή τιμή, χάρη στη δυνατότητα παροχής νερού θερμοκρασίας 17, 20 και 23 °C. Για το φωτισμό χρησιμοποιούνταν λάμπες φθορίου 60W και η φωτοπερίοδος ρυθμιζόταν τεχνητά μεταξύ 13L:11D και 12L:12D. Η αλατότητα ήταν σταθερή στο 35-36‰ και ο κορεσμός του νερού σε οξυγόνο μεγαλύτερος από 90%. Η τροφή περιλάμβανε κυρίως κατεψυγμένους αστερίες, ψάρι (*Boops boops*), γαρίδες, ζωντανά ολοθούρια και αχινούς.



Εικ. 2: Μαρκάρισμα μέσω χάραξης κελυφών τριτώνων του είδους *Charonia sequezea* με τη χρήση Dremel.

Πριν την έναρξη των πειραμάτων όλα τα ζώα μετρήθηκαν, ζυγίστηκαν και μαρκαρίστηκαν. Το ζύγισμα πραγματοποιήθηκε εκτός νερού σε ζυγαριά ακριβείας 2 δεκαδικών ψηφίων και αφαιρώντας συνεχώς το νερό που έβγαζε το άτομο από το σώμα του. Το μαρκάρισμα έγινε με τη χρήση του Dremel (Dremel 400 Digital) το οποίο προσφέρει την δυνατότητα εγχάραξης της εξωτερικής στοιβάδας του κελύφους των τριτώνων ανεξίτηλα (Εικ. 2). Έτσι, στο κέλυφος του κάθε ζώου χαραχτηκε ένας αριθμός για την αναγνώρισή του.

2.1.2.2 Πειραματικές τροφές

Οι πειραματικές τροφές ανήκαν σε δύο κατηγορίες: 1) σε φυσικά θηράματα που αποτελούνταν από 6 τοπικά είδη εχινόδερμων (αστερίες: *Astropecten aranciacus*, *Marthasterias gracialis*, *Luidia sarsi*, αχινοί: *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus*, ολοθούρια: *Holothuria forskali*), και 2) σε πιθανές εναλλακτικές τροφές ευρέως διαθέσιμες στην αγορά που αποτελούνταν από 3 είδη ψαριών (*Boops boops*, *Merluccius merluccius*, *Sardina pilchardus*), 4 είδη μαλακίων (*Sepia officinalis*, *Octopus vulgaris*, *Nototodarus sloanii*, *Mytilus chilensis*) και 2 είδη καρκινοειδών (*Parapenaeus longirostris*, *Nephrops norvegicus*). Τα εχινόδερμα συλλέχθηκαν ζωντανά από τις ακτές της Κρήτης ενώ τα άλλα είδη αγοράστηκαν φρέσκα ή κατεψυγμένα από την τοπική αγορά. Όλες οι τροφές αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-20°C) σε μορφή μερίδων 52 ± 5 g (8.25 % σωματικού βάρους) ελάχιστα μεγαλύτερων από την ημερήσια τιμή της *ad libitum* κατανάλωσης (Doxa *et al.*, 2013). Οι τροφές μεταφέρονταν από τη βαθιά κατάψυξη στη συντήρηση (2-4 °C) για απόψυξη 24h πριν την χορήγησή τους.

2.1.2.3 Πειραματική διαδικασία

Επιλέχθηκαν 9 άτομα από τον πειραματικό πληθυσμό με κριτήρια επιλογής την ομοιομορφία μεγέθους (631.6 ± 24.6 g μέσο βάρος (W) και 23.2 ± 1.3 cm μήκος κελύφους (SL)) και κοινό ιστορικό σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Για τις δοκιμές, κάθε άτομο τοποθετήθηκε σε ένα ενυδρείο 150L, σε περιβαλλοντικές συνθήκες όμοιες με αυτές που περιγράφονται στην ενότητα 2.1 και θερμοκρασία 23.2 ± 0.1 °C. Η κάθε τροφή δοκιμάστηκε σε τρία άτομα μέσω 6 διαδοχικών δοκιμών αποδοχής.

Παρεβλήθει περίοδος νηστείας διάρκειας 1 εβδομάδας μεταξύ των διαφορετικών τροφών. Κατά τη διάρκεια των δοκιμών, σε κάθε ζώο χορηγούνταν γνωστή ποσότητα κατεψυγμένης τροφής κάθε 2 ημέρες, και αφηνόταν να την καταναλώσει για 24 ώρες. Έπειτα, συλλέγονταν και ζυγίζονταν τα υπολείμματα τροφής. Υπολογίστηκε το ποσοστό των επιτυχημένων δοκιμών (όταν το φαγητό καταναλωνόταν) και η κατανάλωση τροφής ανά δοκιμή. Όλα τα χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς των ατόμων κατά τη διάρκεια των δοκιμών (ο τρόπος αντίδρασης και αφύπνισης, η συμπεριφορά αναζήτησης, εντοπισμού και κατανάλωσης τροφής) αποτυπώθηκαν σε αρχεία φωτογραφιών. Καταγράφηκε ο χρόνος που χρειάστηκε για να αντιδράσουν τα ζώα στην παρουσία τροφής (Χρόνος Αφύπνισης) και ο χρόνος προσέγγισής της (Χρόνος Προσέγγισης).

2.1.2.4 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν για κανονικότητα (Kolomogorov–Smirnov test) και ισότητα των διασπορών (Bartlett's test of sphericity). Εφόσον πληρούνταν οι προϋποθέσεις πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς (1-way ANOVA), η οποία δίνει στοιχεία για το αν οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών διαφορετικών ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές ή όχι. Όταν οι μέσες τιμές διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) χρησιμοποιούταν το Tukey's test (HSD test) για την ανάλυση των διαφορών.

2.1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1.3.1 Πρότυπο αντίδρασης στην παρουσία τροφής

Κατά την έναρξη των δοκιμών, τα άτομα βρίσκονταν σε κατάσταση πλήρους ακινησίας εντελώς αποτραβηγμένα μέσα στο κέλυφός τους με κλειστό το πώμα (Εικ. 3Α), ή κολλημένα στα τοιχώματα ή στο πάτωμα του ενυδρείου με τις κεραίες και την προβοσκίδα μέσα στο κέλυφος. Η εισαγωγή της τροφής στα ενυδρεία είτε δεν διατάρασσε την κατάσταση ηρεμίας, είτε προκαλούσε ενεργοποίηση των ζώων που χαρακτηρίζονταν από τις ακόλουθες διαδοχικές κινήσεις: αφύπνιση-αναζήτηση-ανακάλυψη-κατανάλωση της τροφής. Η πρώτη περίπτωση χαρακτηρίστηκε ως μη αποδοχή και η δεύτερη ως αποδοχή.

Όταν η αντίδραση στην παρουσία τροφής ήταν θετική, όλοι οι τρίτωνες ακολουθούσαν το ίδιο πρότυπο συμπεριφοράς, που εκφράζεται ως η διαδοχή των 5 διακριτών φάσεων με την σειρά που αναφέρθηκαν παραπάνω και που περιγράφονται αναλυτικότερα ως εξής:

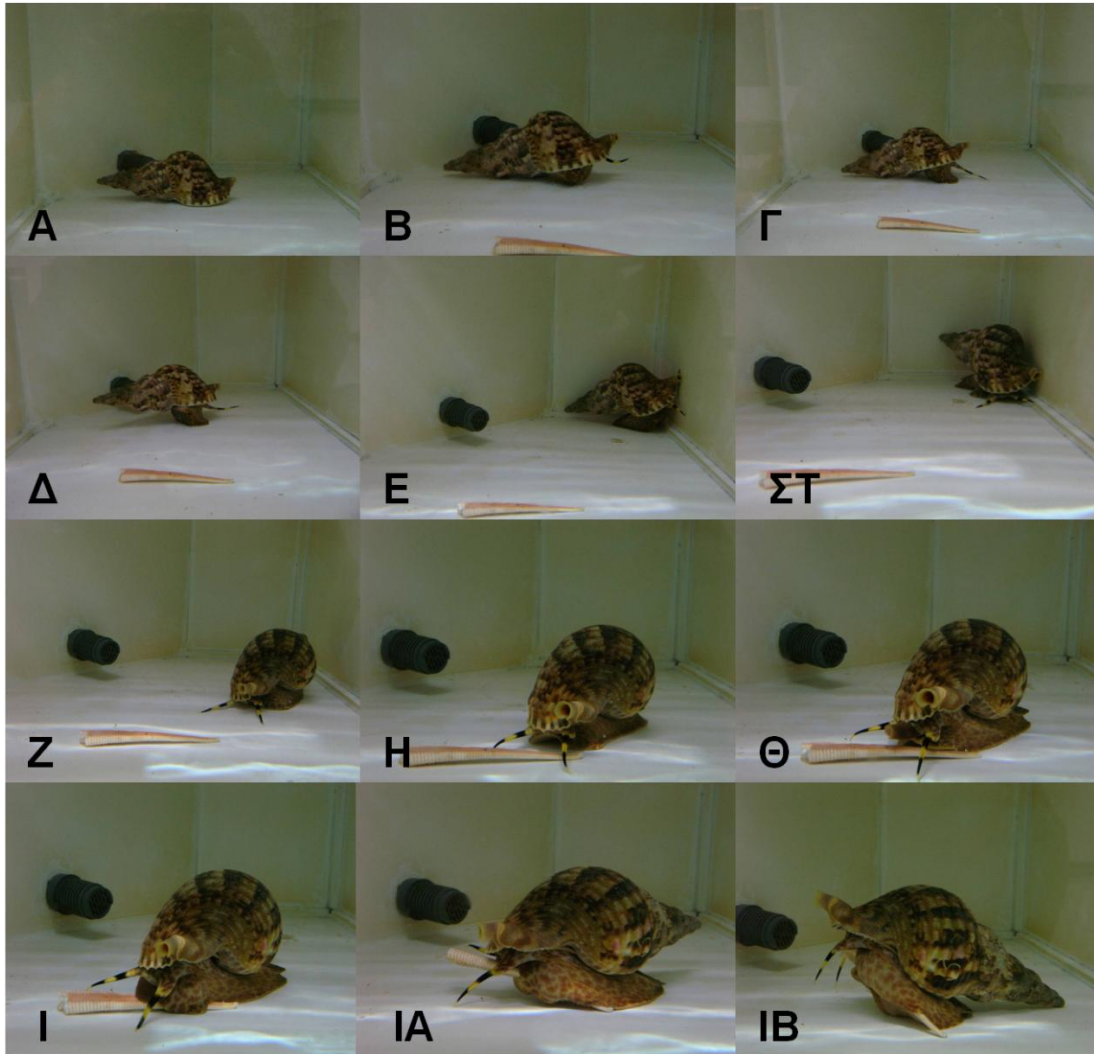
1) Η φάση της αφύπνισης χαρακτηρίζεται από έκταση των κεραιών (Εικ. 3Β), που ακολουθείται από έκταση του πόδα και κίνηση του ζώου (Εικ. 3Γ-ΣΤ),

2) Η φάση της διερεύνησης χαρακτηρίζεται από τον προσανατολισμό του σώματος προς την τροφή, που ανιχνεύεται με τη βοήθεια των κεραιών (Εικ. 3 Ζ-Η). Η αναζήτηση της τροφής γίνεται με ανασήκωμα του κεφαλιού και λίκνισμα των κεραιών δεξιά και αριστερά.

3) Η φάση της ανακάλυψης και της ακινητοποίησης της τροφής χαρακτηρίζεται από έκταση της προβοσκίδας και κάλυψη της τροφής με τον πόδα (Εικ. 3 Θ-Ι).

4) Ακολουθεί η φάση της κατανάλωσης της τροφής, κατά την οποία το ζώο παραμένει ακίνητο, και έχοντας εγκλωβίσει την τροφή με τον πόδα του αποσπά τεμαχίδια με την προβοσκίδα του, στο άκρο της οποίας είναι τοποθετημένο το ξύστρο (Εικ. 3 ΙΑ-ΙΒ).

5) Η φάση του κορεσμού, χαρακτηρίζεται από τον απεγκλωβισμό των υπολειμμάτων τροφής από τον πόδα και την επιστροφή των τριτώνων σε μια από τις αρχικές καταστάσεις ηρεμίας.

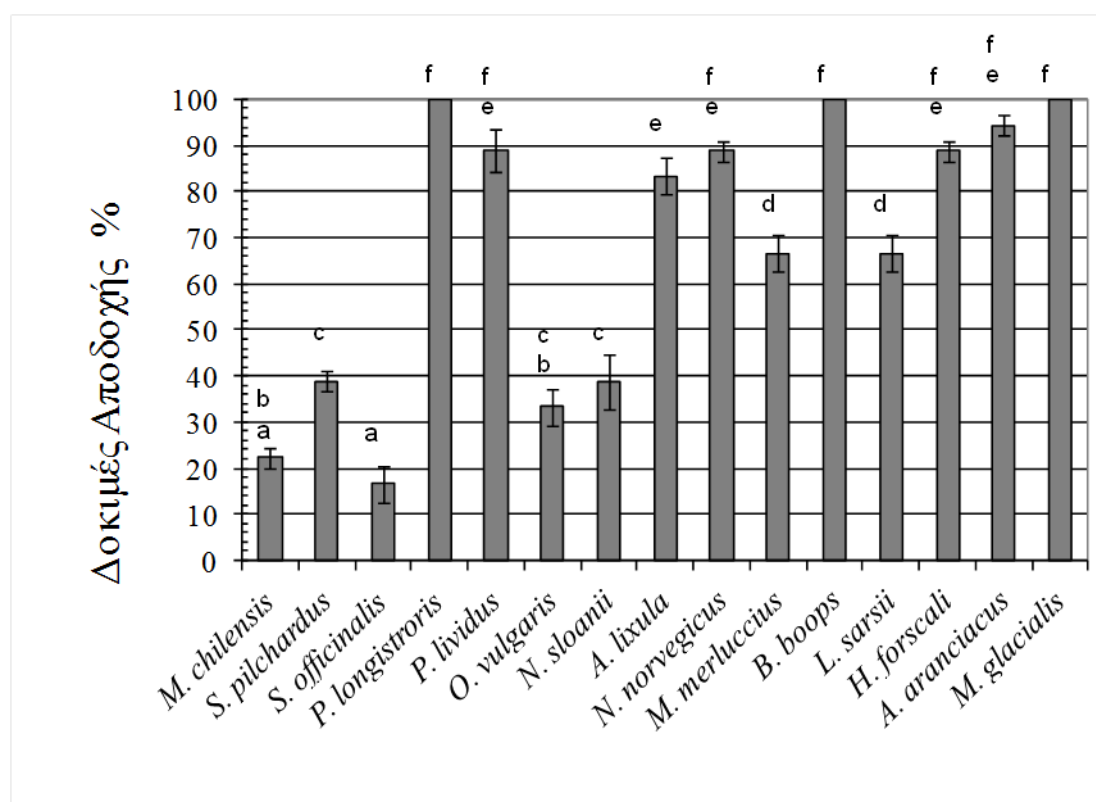


Εικ. 3: Απεικόνιση της συμπεριφοράς κατανάλωσης τροφής από τον τρίτονα *Charonia seguenzae*. Α) Το άτομο παραμένει ακίνητο μέσα στο κέλυφός του. Β-Δ) Απόκριση στην τροφή (*Luidia sarsi*) που εκφράζεται από την έκταση των κεραιών και την ακόλουθη έκταση του πόδα. Ε-Η) Κίνηση προς την τροφή. Θ) Έκταση της προβοσκίδας. Ι-ΙΒ) Χρήση του πόδα για την ακινητοποίηση της τροφής και της προβοσκίδας για τον τεμαχισμό και την κατάποση των τεμαχιδίων της τροφής.

2.1.3.2. Ποσοστό αποδοχής

Η αντίδραση των τριτώνων στην παρουσία φαγητού ήταν πάντα του τύπου «όλα ή τίποτα». Κατά τις δοκιμές μη αποδοχής δεν παρατηρήθηκε καμία ορατή μεταβολή στην αρχική κατάσταση του ζώου, ενώ κατά τη διάρκεια των δοκιμών αποδοχής, όλες οι τροφές που προκάλεσαν την αφύπνηση των τριτώνων, προκάλεσαν και τις φάσεις της αναζήτησης και εντοπισμού της τροφής που με την σειρά τους ακολουθήθηκαν από την κατανάλωσή της.

Το ποσοστό των δοκιμών αποδοχής διέφερε στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) μεταξύ των τροφών. Ο αστερίας *Marthasteria glacialis*, το ψάρι *Boops boops* και η γαρίδα *Parapenaeus longirostris* παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά με 100% επιτυχημένη απόκριση στις δοκιμές ενώ η σουπιά *Sepia officinalis* και το μύδι *Mytilus chilensis* παρουσίασαν τα χαμηλότερα ποσοστά με 16.7% και 22.2% αντίστοιχα (Εικ. 4). Συνολικά, όλα τα εχινόδερμα, τα καρκινοειδή και τα ψάρια, εκτός του *Sardina pilchardus*, παρουσίασαν ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών μεγαλύτερο του 60%.



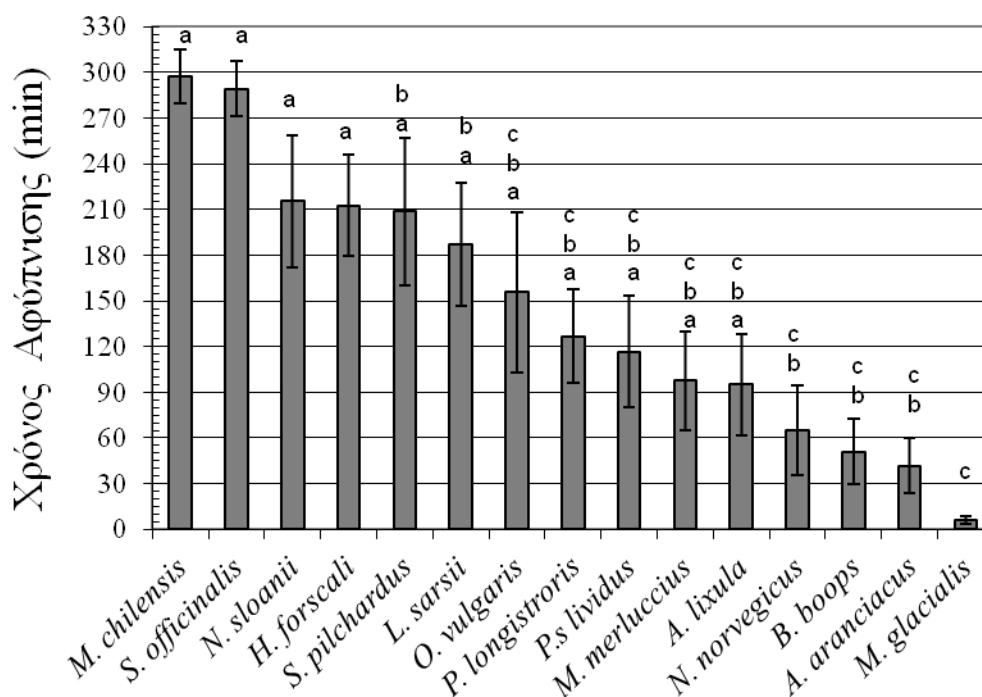
Εικ. 4: Δοκιμές αποδοχής (%) του *Charonia seguenzae* ανά είδος τροφής. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).

2.1.3.3. Δυναμική απόκρισης στην τροφή

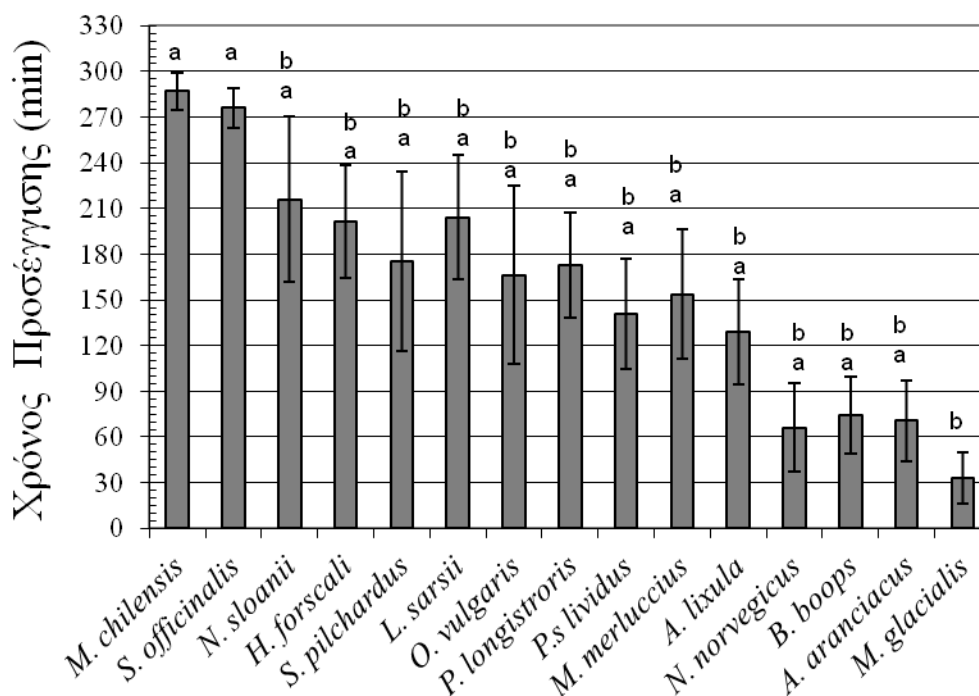
Όταν ήταν θετική, η απόκριση στην παρουσία τροφής στο ενυδρείο (αφύπνιση) έλαβε χώρα 1 λεπτό με 5 ώρες μετά την εισαγωγή της τροφής, ανάλογα με το είδος της (Εικ. 5). Οι διακυμάνσεις στις τιμές του χρόνου αντίδρασης των ατόμων που καταλάωναν την ίδια τροφή δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα,

οι διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές τροφές ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.001$) με τον μικρότερο μέσο χρόνο αντίδρασης, 6.2 ± 2.6 min, κατά τη χορήγηση του αστερία *Marthasterias glacialis*, και τον μεγαλύτερο, 297.2 ± 17.5 min, κατά τη χορήγηση μυδιού *Mytilus chilensis*.

Ο χρόνος προσέγγισης της τροφής, δηλαδή ο χρόνος που μεσολαβεί από την αφύπνιση μέχρι την πρώτη επαφή με την τροφή, διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τροφών (Εικ. 6). Και σε αυτή την περίπτωση ακολουθήθηκε το ίδιο πρότυπο, με τον μικρότερο χρόνο προσέγγισης, 33.05 ± 17.06 min, να παρατηρείται παρουσία του αστερία *M. glacialis* και τον μεγαλύτερο, 287 ± 12.4 min, παρουσία του μυδιού *M. chilensis*.



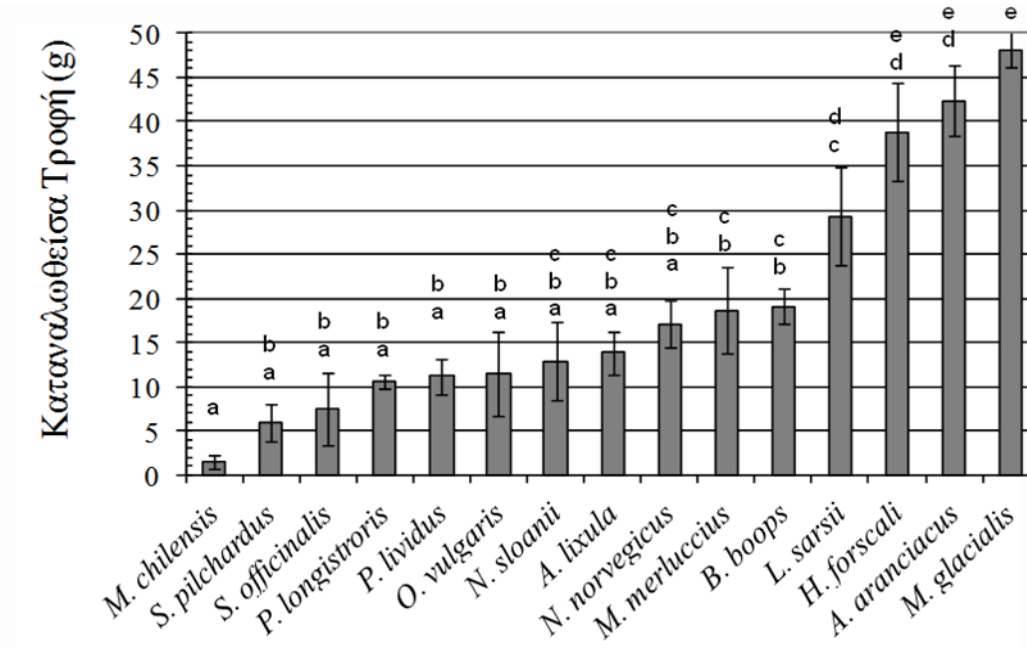
Εικ. 5: Χρόνος αφύπνισης (min) του *Charonia seguenzae* ανάλογα με το είδος τροφής που του προσφέρθηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).



Εικ. 6: Χρόνος προσέγγισης (min) της τροφής από το *Charonia seguenzae* ανάλογα με το προσφερόμενο είδος τροφής. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).

2.1.3.4. Κατανάλωση τροφής

Η χορήγηση διαφορετικών ειδών ψαριών και ασπονδύλων, εκτός από το ποσοστό δοκιμών αποδοχής και τους χρόνους αφύπνισης και προσέγγισης, επηρέασε και την ποσότητα τροφής που καταναλώθηκε. Έτσι λοιπόν, η καταναλωθείσα ποσότητα τροφής εξαρτάται άμεσα από το είδος της (Εικ. 7), με τις υψηλότερες προτιμήσεις να παρατηρούνται μεταξύ των αστεριών *Marthasterias glacialis* ($48.2 \pm 3.9g$) και *Astropecten aranciacus* ($42.4 \pm 3.9g$) και τις χαμηλότερες για τα *Mytilus chilensis* ($1.5 \pm 0.8g$), *Sardina pilchardus* ($6.0 \pm 2.1g$) και *Sepia officinalis* ($7.5 \pm 4.1g$). Ανάμεσα στις υπόλοιπες τροφές, οι μεγαλύτερες καταναλωθείσες ποσότητες καταγράφηκαν κατά τη χορήγηση των *Boops boops* ($19.1 \pm 2.1g$), *Merluccius merluccius* ($18.7 \pm 4.8g$) και *Nephrops norvegicus* ($17.1 \pm 2.7g$), τιμές μεγαλύτερες και από αυτές των φυσικών θηραμάτων όπως οι αχινοί *Arbacia lixula* ($13.9 \pm 2.5g$) and *Paracentrotus lividus* ($11.1 \pm 2.1g$). Οι διαφορές στην κατανάλωση των διαφόρων ειδών ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.001$).



Εικ. 7: Ποσότητα καταναλωθείσας τροφής (g) από το *Charonia seguenzae* ανάλογα με το είδος τροφής. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).

2.1.3.5. Ιστοειδική επιλεκτικότητα

Εκτός από την επιλεκτικότητα που εμφάνισαν έναντι των διαφορετικών ειδών, οι τρίτωνες εμφάνισαν μια ιστοειδική επιλεκτικότητα καταναλώνοντας συγκεκριμένους ιστούς. Οι αστερίες, τα ολοθούρια και τα μύδια (χορηγήθηκαν χωρίς κέλυφος) καταναλώθηκαν εξολοκλήρου, χωρίς να υπάρξει επιλογή κάποιων ιστών. Αντίθετα, από τις υπόλοιπες τροφές καταναλώθηκαν μόνο οι μαλακοί ιστοί, ενώ οι σκληρές δομές έμειναν άθικτες (Πίνακας 1). Από τα ψάρια κατανάλωσαν το δέρμα, τα εντόσθια και τη σάρκα ενώ άφησαν το κεφάλι και την σπονδυλική στήλη. Όσον αφορά στους αχινούς, άνοιξαν μια τρύπα στο κέλυφός τους με το ξύστρο τους και κατανάλωσαν μόνο το εσωτερικό τους. Αντίστοιχα, χρησιμοποίησαν την προβοσκίδα τους για να διαπεράσουν τον μαλακό εξωσκελετό που βρίσκεται στην κοιλιακή πλευρά των καρκινοειδών και κατανάλωσαν μόνο τους μαλακούς ιστούς.

Πίνακας 1: Ιστοειδική προτίμηση του *Charonia sequeenzae* σε επιλεγμένους ιστούς των τροφών που εξετάστηκαν.

Είδος	Ιστοί που δεν καταναλώθηκαν
<i>Arbacia lixula, Paracentrotus lividus</i>	Ακτίνες, Κέλυφος, Λύχνος του Αριστοτέλη
<i>Boops boops, Merluccius merluccius, Sardina pilchardus</i>	Σκελετός (Κεφάλι, Σπονδυλική στήλη, Πτερύγια)
<i>Sepia officinalis</i>	Cuttlebone, Ξύστρο
<i>Octopus vulgaris</i>	Ξύστρο
<i>Nototodarus sloanii</i>	Gladius, Ξύστρο
<i>Parapenaeus longirostris, Nephrops norvegicus</i>	Εξωσκελετός
<i>Astropecten aranciacus, Marthasterias gracialis, Luidia sarsi, Holothuria forskali, Mytilus chilensis</i>	Κανένα

2.1.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη φύση, η διατροφή των τρίτωνων αποτελείται από αστερίες, ολοθούρια και αχινούς (Chesher, 1969, Laxton, 1971, Percharde, 1972, Endean & Stablum 1973, Russo *et al.*, 1990). Από αυτά τα εχινόδερμα, οι αστερίες φαίνεται να τυχαίνουν μεγαλύτερης προτίμησης (Kang & Kim, 2004, Doxa *et al.*, 2006). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι οι τρίτωνες, εκτός από τα φυσικά τους θηράματα, μπορούν να καταναλώσουν ποικιλία ευρέως διαθέσιμων στην αγορά καρκινοειδών, μαλακίων και ψαριών. Οι αστερίες *Marthasterias glacialis* και *Astropecten aranciacus* ήταν τα είδη με την μεγαλύτερη προτίμηση, μιας και παρουσίασαν τις υψηλότερες ποσότητες καταναλωθείσας τροφής, το μεγαλύτερο ποσοστό δοκιμών αποδοχής και τους μικρότερους χρόνους αφύπνισης και προσέγγισης. Παρά το γεγονός ότι τα *Holothuria forskali* και *Luidia sarsi* παρουσίασαν τις επόμενες καλύτερες τιμές καταναλωθείσας τροφής, οι χρόνοι αφύπνισης και προσέγγισης ήταν αρκετά πιο μεγάλοι. Ανάμεσα στις εναλλακτικές τροφές, η μεγαλύτερη κατανάλωση και οι μικρότεροι χρόνοι αφύπνισης και προσέγγισης παρατηρήθηκαν στα είδη *Boops boops*, *Merluccius merluccius* και *Nephrops norvegicus*, με τιμές καλύτερες από αυτές φυσικών θηραμάτων όπως οι αχινοί *Arbacia lixula* και *Paracentrotus lividus*. Τα είδη που καταναλώθηκαν λιγότερο *M. chilensis*, *S. pilchardus* και *S. officinalis*, παρουσίασαν και το μικρότερο ποσοστό δοκιμών αποδοχής αλλά και τους μεγαλύτερους χρόνους αφύπνισης και προσέγγισης.

Οι τρίτωνες μπορεί να είναι περιστασιακά νεκροφάγοι (Percharde, 1972) αλλά το βασικό πρότυπο που ακολουθούν στη φύση είναι αυτό της ενεργής θήρευσης (Russo *et al.*, 1990). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι τρίτωνες δύνανται να καταναλώσουν είδη που δεν μπορούν να κυνηγήσουν στη φύση, μιας και είναι γρηγορότερα ή/και ενεργοί κολυμβητές (κεφαλόποδα, ψάρια, καρκινοειδή), και προτείνει ότι οι τρίτωνες εμφανίζουν μια πολύ μεγάλη ικανότητα διατροφικής προσαρμογής σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Τα είδη που δοκιμάστηκαν, εκτός των εχινόδερμων, είναι ευρέως διαθέσιμα και άμεσα προσβάσιμα σε κάθε αγορά. Γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για προγράμματα μαζικής εκτροφής. Η γνώση του φάσματος τροφών που δύνανται να καταναλώσει ένα ζώο είναι απαραίτητη για την διατήρησή του σε συνθήκες αιχμαλωσίας, καθώς η παροχή ποικιλίας τροφών και συνεπώς η

δυνατότητα εκδήλωσης προτίμησης είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ευζωία (welfare) του (Swaisgood, 2007).

Η αντίληψη της παρουσίας τροφής στα γαστερόποδα γίνεται μέσω χημικών σημάτων (Croll, 1983). Στα προσοβράγχια γαστερόποδα υπάρχουν ποικίλα όργανα που σχετίζονται με την χημειοποδοχή. Η Chrisp (1971) έδειξε ότι η εφαρμογή εκχυλισμάτων τροφής στις κεφαλικές κεραίες, το πρόσθιο τμήμα του πόδα και την άκρη του σιφώνα προκάλεσε συμπεριφορικές αποκρίσεις που σχετίζονταν με την αντίληψη της παρουσίας τροφής. Ένα άλλο όργανο, το οποίο βρίσκεται στη μανδουακή κοιλότητα, είναι χημειοευαίσθητο και φέρεται να παίζει ρόλο στη χημειοποδοχή είναι το οσφράδιο (Kohn, 1961, Bailey & Laverack, 1966). Σύμφωνα με τον Laxton (1971), οι θηρευτές της οικογένειας ranellidae αντιλαμβάνονται την παρουσία τροφής μέσω του οσφραδίου, καθώς το νερό που περνάει μέσα στη μανδουακή κοιλότητα μεταφέρει χημικά σήματα σε αυτό. Στις εικόνες 3A και 3B φαίνεται ξεκάθαρα ότι η παρουσία τροφής προκαλεί την αφύπνιση του τρίτωνα. Φαίνεται ότι οι τρίτωνα μπορούν να ξεχωρίσουν τα χημικά σήματα που εκκρίνουν οι διαφορετικές τροφές. Έτσι, τροφές όπως π.χ. η σουπιά δεν προκάλεσαν καμία απολύτως απόκριση στους τρίτωνα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%, ενώ υπήρξαν τροφές που προκάλεσαν 100% θετική απόκριση. Πιθανώς ενεργό ρόλο στην αναζήτηση τροφής εκτός από το οσφράδιο να παίζουν και οι κεραίες καθώς είναι το πρώτο τμήμα του τρίτωνα που εμφανίζεται εκτός κελύφους κατά την αφύπνιση (Εικ. 3B) ενώ παρατηρείται λίκνισμα των κεραιών κατά τη διάρκεια της αναζήτησης της τροφής (Εικ. 3E-3Z). Η χρήση των κεραιών για την αίσθηση της τροφής στο περιβάλλον έχει περιγραφεί και σε άλλα γαστερόποδα όπως αυτά των γενών *Aplysia* και *Lymnaea* (για ανασκόπηση βλ. Elliott & Susswein, 2002). Όμως, ο Morton (2012), αν και αναφέρει ότι το άτομο *C. lampas* που εξέτασε αναζητά την τροφή του δεν κάνει αναφορά στη κίνηση των κεραιών. Ο Chase (2002) αναφέρει ότι όταν τα γαστερόποδα είναι αρκετά κοντά στην τροφή, το στόμα κατευθύνεται προς αυτή μέσω ενός συνδυασμού όσφρησης, και χημειοποδοχής εξ επαφής και μηχανοποδοχής. Στα σαρκοφάγα είδη, μπορεί να υφίσταται μια ξεχωριστή φάση αιχμαλώτισης του θηράματος που λαμβάνει χώρα μετά την προσέγγιση της τροφής και πριν την κατανάλωσή της. Η φάση της αιχμαλώτισης στο *C. seguenzae* είναι όμοια με αυτή που έχει περιγραφεί για το *Pleurobranchea*, που περιλαμβάνει την ακινητοποίηση του θηράματος με τον πόδα και την έκταση της προβοσκίδας με την οποία «δαγκώνει» το θήραμα (Davis & Mpitsos, 1971), ενώ διαφέρει από το

συγγενικό *C. lampas* στο οποίο δεν παρατηρείται έκταση της προβοσκίδας και ακινητοποίηση της τροφής. Σύμφωνα με τον Percharde (1972), το *Charonia variegata* εκχύνει όξινο σάλιο μέσω της προβοσκίδας του που προκαλεί παράλυση στο θήραμα, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε για το *C. lampas*.

Οι τρίτωνες παρουσίασαν επιλεκτικότητα και ως προς τους ιστούς που κατανάλωσαν. Έτσι, κατά τη χορήγηση αστεριών, ολοθουρίων και μυδιών (ψύχα) κατανάλωσαν ολόκληρο το ζώο, ενώ όταν χορηγήθηκαν αχινοί, ψάρια, καρκινοειδή και κεφαλόποδα επέλεξαν να τραφούν μόνο με τους μαλακούς ιστούς (μύες και σπλάχνα) αφήνοντας τις σκληρές δομές (Πίνακας 1). Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν οι τρίτωνες δεν έχουν άμεση πρόσβαση στους μαλακούς ιστούς, όπως στην περίπτωση του αχινού και των καρκινοειδών, τρυπούν με το ξύστρο τους το σκληρό περίβλημα και τρέφονται με τους μαλακούς ιστούς. Αντίστοιχη συμπεριφορά περιγράφεται από τον Laxton (1971) για το *C. lampas* στη Νέα Ζηλανδία, το οποίο τρυπάει το σκληρό σκελετό του αστερία και τρέφεται με τους μαλακούς ιστούς στο εσωτερικό του. Όμως ενώ ο Laxton (1971) αναφέρει ότι το *C. lampas* καταναλώνει μόνο τους μαλακούς ιστούς των αστεριών, το *C. seguenzae*, όπως και το *C. lampas* που μελετήθηκε από τον Morton (2012), κατανάλωσε ολόκληρα τα κομμάτια αστερία που τους χορηγήθηκαν τους αστερίες που ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με αυτό που περιγράφει ο Morton (2012) για το *C. lampas*, καταναλώνοντας ολόκληρο το κομμάτι του αστερία που του χορηγήθηκε. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν στο ότι οι τρίτωνες παρουσιάζουν έντονη διατροφική «ευελιξία» και προσαρμοστικότητα, καθώς έχουν τη δυνατότητα να τροποποιήσουν τη διατροφική τους συμπεριφορά τόσο ως προς το είδος τροφής που καταναλώνουν αλλά και ως τον τρόπο κατανάλωσης τους. Η διατροφική «ευελιξία» αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό ανάμεσα στα γαστερόποδα, με τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία να προσαρμόζονται στις αλλαγές του περιβάλλοντος (Elliott & Susswein, 2002). Η γνώση της διατροφικής συμπεριφοράς και της δυνατότητας προσαρμογής του *C. seguenzae* που παρέχει η παρούσα μελέτη, μπορεί να αποδειχθεί πολύ χρήσιμη αν χρησιμοποιηθεί για οικολογικούς σκοπούς καθώς και στην υδατοκαλλιέργεια.

Μέρος των αποτελεσμάτων αυτού του κεφαλαίου δημοσιεύτηκαν στο *Journal of Molluscan Studies* (Doxa *et al.*, 2012).

2.2 Διατροφικές προτιμήσεις υπό συνθήκες εκτροφής

2.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών παραγόντων εμπλέκεται στον καθορισμό της διατροφικής προτίμησης των γαστερόποδων βασιζόμενης στα χημικά σήματα και την χημειούποδοχή (ανασκόπηση από Croll, 1983). Σίγουρα ένας από τους πιο σημαντικούς είναι η προηγούμενη εμπειρία καθώς πολλές μελέτες αναφέρουν ότι τα γαστερόποδα μπορούν να συσχετίσουν τα χημικά σήματα που εκλύουν οι τροφές με δυσάρεστες συνέπειες και να εξαλείψουν αυτές τις τροφές από το διαιτολόγιό τους (Gelperin, 1975, Mpitsos & Collins, 1975, Mpitsos *et al.*, 1978, Davis *et al.*, 1980). Αντιστρόφως, πολλά είναι και τα γαστερόποδα που χρησιμοποιούν χημικά σήματα ειδικά για τροφές που είναι ασφαλείς, βρίσκονται σε αφθονία και έχουν αποδεδειγμένη διατροφική επάρκεια (Carefoot, 1967, Murdock, 1969, Croll & Chase, 1980). Παρά το γεγονός ότι η προηγούμενη εμπειρία παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των διατροφικών προτιμήσεων στα γαστερόποδα, εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες. Ο πιο σημαντικός από αυτούς είναι η έμφυτη προτίμηση για συγκεκριμένα χημικά σήματα που εκλύουν οι τροφές (Murdock, 1969, Croll & Chase, 1977, 1980).

Οι κυριότερες ουσίες που λειτουργούν ως χημικά σήματα και προκαλούν διατροφικές αποκρίσεις στα γαστερόποδα είναι τα αμινοξέα (Croll, 1983, Zimmer & Butman, 2000), τα οποία ευθύνονται τόσο για την επιλογή της κατανάλωσης ή μη μιας τροφής όσο και για τον εντοπισμό ενός μακρινού θηράματος (Atema, 1980). Άλλες ουσίες που φαίνεται να προσελκύουν τα υδρόβια γαστερόποδα είναι οι μονο και δισακχαρίτες (Jager, 1970), το γλυκογόνο (Carr, 1967) και οι πρωτεΐνες, και σε κάποιες περιπτώσεις, σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτές των αμινοξέων (Chase, 2002). Η συγκέντρωση των ουσιών αυτών επηρεάζει τον βαθμό απόκρισης των γαστερόποδων σε αυτά, ενώ αναφέρεται ότι έχει παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις και συνεργατική δράση (Croll, 1983). Στα υδάτινα περιβάλλοντα, η κατανομή των χημικών σημάτων είναι απρόβλεπτη και ανομοιόμορφη εξαιτίας των

ρευμάτων και των αναταράξεων. Για να μπορούν να εντοπίσουν τα χημικά αυτά σήματα στο νερό, τα προσοβράγχα γαστερόποδα έχουν αναπτύξει ποικίλα όργανα που σχετίζονται με την χημειούποδοχή (Croll, 1983) εκ των οποίων τα κυριότερα είναι το οσφράδιο που βρίσκεται στη μανδουακή κοιλότητα (Kohn, 1961, Bailey & Laverack, 1966) και οι κεφαλικές κεραίες, το πρόσθιο τμήμα του πόδα και η άκρη του σίφωνα (Chrisp, 1971). Σύμφωνα με τον Laxton (1971), οι θηρευτές της οικογένειας Ranellidae αντιλαμβάνονται την παρουσία τροφής μέσω του οσφραδίου, καθώς το νερό που περνάει μέσα στη μανδουακή κοιλότητα μεταφέρει χημικά σήματα σε αυτό ενώ από τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας φαίνεται ότι ενεργό ρόλο στον εντοπισμό της τροφής παίζουν και οι κεραίες.

Η επιλογή τροφής στην φύση γίνεται σπάνια με βάση την αφθονία της, αλλά είναι αποτέλεσμα εκδήλωσης προτίμησης (Paine, 1980). Τα πειράματα που αποσκοπούν στον καθορισμό αυτών των προτιμήσεων είναι πολλά (π.χ. Paine, 1969, Carefoot, 1973, Fairweather & Underwood, 1983, Steinberg, 1985, Enderlein *et al.*, 2003, Palacios & Ferraro, 2003, Floeter & Temming, 2003, 2005). Η κατανάλωση διαφορετικών θηραμάτων μπορεί να έχει διαφορετικές συνέπειες στο ρυθμό αύξησης, την επιβίωση ή την αναπαραγωγική επιτυχία των θηρευτών και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η εκδήλωση προτίμησης ως προς τα θηράματα που καταναλώνουν οι θηρευτές είναι τόσο διαδεδομένη επειδή η κατανάλωση συγκεκριμένων τύπων θηραμάτων προσφέρει επιλεκτικό πλεονέκτημα (selective advantage, Micheli, 1995). Η διατροφική προτίμηση των ειδών και συνεπώς η τροφική τους θέση σε μια κοινότητα μας δίνει πολλές πληροφορίες για την οργάνωση της κοινότητας (Paine, 1980) οι οποίες είναι απαραίτητες για πολλούς πρακτικούς οικολογικούς σκοπούς. Κάποιοι από αυτούς μπορεί να είναι η διαχείριση της βιοποικιλότητας, η βιομεγέθυνση (biomagnification) και ο βιοχειρισμός (biomanipulation) με απώτερο στόχο την οικολογική αποκατάσταση. Επίσης, στη φύση, τα ζώα γενικά επιλέγουν την τροφή τους, και διακρίνονται σε αυτά που τρέφονται με θηράματα που πληρούν εξολοκλήρου τις διατροφικές τους ανάγκες και σε αυτά που χρειάζεται να καταναλώσουν μια ποικιλία θηραμάτων για να τις καλύψουν, ενεργώντας μέσα στα πλαίσια της μεγιστοποίησης της καθαρής απόδοσης ενέργειας της τροφής που καταναλώθηκε.

Για το λόγο αυτό, στην δεύτερη ενότητα της παρούσας μελέτης, χορηγήθηκε στους τρίτονες μία ποικιλία διαφορετικών τροφών από τις οποίες είχαν την δυνατότητα να επιλέξουν αυτήν(ές) που προτιμούν. Τα αποτελέσματα της επιλογής

τους θα μας βοηθήσουν στην κατανόηση των διατροφικών τους αναγκών που είναι εναρμονισμένες με τις μεταβολικές τους διεργασίες, όπως αυτές αναπτύχθηκαν μέσα σε αρκετά εκατομμύρια χρόνια εξελικτικής πορείας.

2.2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.2.1 Κατά προσέγγιση βιοχημική ανάλυση τροφών

Οι βιοχημικές αναλύσεις των τροφών που χρησιμοποιήθηκαν στις ενότητες 2.2 και 2.3 πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο διατροφής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Για την πραγματοποίηση της κατά προσέγγιση βιοχημικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν 2-4 γραμμάρια ομογενοποιημένου ιστού. Αναλύθηκαν μόνο τα τμήματα των τροφών που επέλεξαν να καταναλώσουν οι τρίτωνες, δηλαδή ολόκληρο το σώμα αστερία, φιλέτο ψαριού με το δέρμα και τα λέπια, μυϊκός ιστός καλαμαριού και κοιλία αποφλοιωμένης γαρίδας. Για τον υπολογισμό του ολικού λίπους, των ολικών πρωτεϊνών, της υγρασίας και της τέφρας των ιστών, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφονται παρακάτω. Τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων εκφράζονται σε επί τοις % υγρής μάζας.

A) Μέτρηση υγρασίας

Για τη μέτρηση της υγρασίας των ιστών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ξήρανσης με αερισμό. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε προθερμασμένο και ζυγισμένο αλουμινοχαρτο, και όλα μαζί στη συνέχεια ζυγίζονταν, και αφυδατώνονταν σε φούρνο στους $110 \pm 1^\circ \text{C}$, μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος τους.

B) Μέτρηση τέφρας ιστών

Η τέφρα αποτελείται από τα ανόργανα κατάλοιπα που παραμένουν μετά από αποτέφρωση των ιστών σε 600°C . Όλα τα ασταθή συστατικά και ο άνθρακας αφαιρούνται κατά τη διαδικασία αυτή και τα στοιχεία ανάγονται σε πιο σταθερές μορφές, συνήθως οξείδια ή άλατα. Προς τούτο χρησιμοποιήθηκαν ένας ηλεκτρικός φούρνος και πορσελάνινα σκεύη, μέσα στα οποία τοποθετούνταν τα δείγματα που αποτελούνταν από γνωστή ποσότητα ζωικού ιστού (2-4 g). Στη συνέχεια, αυτά θερμαίνονταν στον ηλεκτρικό φούρνο για 6 ώρες και ζυγίζονταν.

Γ) Απόσπαση ολικών λιπών

Η απόσπαση ολικών λιπών από τους ιστούς, περιλάμβανε την ζύγιση και τοποθέτηση 2,5 γραμμαρίων των ομογενοποιημένων δειγμάτων μέσα σε πλαστικά δοχεία και προσθήκη διαλύματος χλωροφορμίου – μεθανόλης (Chloroform-Methanol 2/1 v/v) αρχικά σε αναλογία 1:5 και μετά από πολύ καλή ανάδευση σε τελική αναλογία 1:15. Έπειτα, αφού τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο τοποθετήθηκαν στους 4°C για 20 λεπτά, για να διαλυθούν όλα τα λίπη που περιέχονται στον ιστό μέσα στο διαλύτη. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, τα δείγματα φιλτράρονταν σε φίλτρο Νο 4. Στο προϊόν του φιλτραρίσματος προστέθηκε υδατικό διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου (Aqueous MgCl₂ 0,027% w/v) σε αναλογία 1:10, και αφού η επιφάνεια του δ/τος ήρθε σε επαφή με αέριο άζωτο, φυγοκεντρήθηκε στις 800rpm για πέντε λεπτά. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, που ουσιαστικά αποτελούνταν από τη μεθανόλη και το νερό που περιέχεται στον ιστό, φιλτραρίστηκε το εναπομείναν χλωροφόρμιο, μέσα στο οποίο είναι διαλυμένα τα λίπη, σε φίλτρο Νο 4 με άνυδρο άλας ούτως ώστε να απομακρυνθεί κάθε ίχνος νερού από το δείγμα. Τέλος, το διάλυμα χλωροφορμίου – λιπών τοποθετήθηκε σε ειδικές γυάλινες φιάσκες γνωστού βάρους και στην συνέχεια στον εξολκέα, μια συσκευή που εξατμίζει το διαλύτη, με αποτέλεσμα μέσα στις γυάλινες φιάσκες να απομονώνονται τα λίπη. Αφού εξατμίζονταν όλος ο διαλύτης, οι φιάσκες ζυγίζονταν για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του κάθε ιστού σε λίπος.

Δ) Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών

Για τη μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των ιστών χρησιμοποιήθηκε το FP-528 της LECO, το οποίο υπολογίζει την ποσότητα αζώτου που περιέχουν τα δείγματα που αναλύει. Δεδομένου ότι το ποσοστό του αζώτου στις πρωτεΐνες ανέρχεται στο 16%, γνωρίζοντας το ποσοστό του αζώτου που περιέχει ένας ιστός μπορεί να υπολογιστεί με αναγωγή και το ποσοστό των πρωτεϊνών. Η χρήση του FP-528 είναι ιδιαίτερα απλή. Γνωστή ποσότητα δείγματος (περίπου 100 mg) τοποθετείται σε ειδικές αλουμινένιες κάψουλες από τις οποίες αφαιρείται οποιαδήποτε ποσότητα αέρα και τοποθετούνται στην ειδική κεφαλή του μηχανήματος. Από εκεί, το δείγμα πέφτει σε μία ζεστή κάμινο και περικλείεται με καθαρό οξυγόνο για μια εξαιρετικά

ταχεία καύση. Τα υποπροϊόντα της καύσης – CO₂, H₂O NO_x, και N₂ – περνούν από το φίλτρο της καμίνου και από ένα θερμοηλεκτρικό ψύκτη για τελική συλλογή τους σε μια συσκευή σταθεροποίησης. Έπειτα, μέρος του μείγματος μετρίεται με τη μέθοδο της θερμικής αγωγιμότητας στοιχείου για άζωτο. Το σύστημα ελέγχεται από έναν εξωτερικό ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση λογισμικού που λειτουργεί σε περιβάλλον Windows στο οποίο εισάγεται το βάρος των δειγμάτων από το οποίο υπολογίζεται απευθείας το ποσοστό του αζώτου και ανάλογα με τον πρωτεϊνικό παράγοντα του δείγματος το ποσοστό των πρωτεϊνών.

Ε) Υπολογισμός υδατανθράκων

Το % ποσοστό των υδατανθράκων που εμπεριέχονται στους ιστούς των τροφών που καταναλώθηκαν υπολογίστηκε βάση των αποτελεσμάτων των προαναφερθέντων αναλύσεων. Επειδή τα πέντε βασικά συστατικά ενός ιστού είναι η υγρασία, η τέφρα, τα ολικά λίπη, οι ολικές πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες, για να υπολογίσουμε το ποσοστό των υδατανθράκων αφαιρούμε από το 100% το άθροισμα τα ποσοστά των υπόλοιπων συστατικών.

ΣΤ) Υπολογισμός ενέργειας

Η ενέργεια που εμπεριέχεται στις τροφές και τα περιττώματα υπολογίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Garling & Wilson (1976). Έτσι, η ενέργεια ανά γραμμάριο πρωτεϊνών και υδατανθράκων ανέρχεται στα 4 Kcal και ανά γραμμάριο λιπών στα 9 Kcal.

2.2.2.2 Πειραματικές τροφές

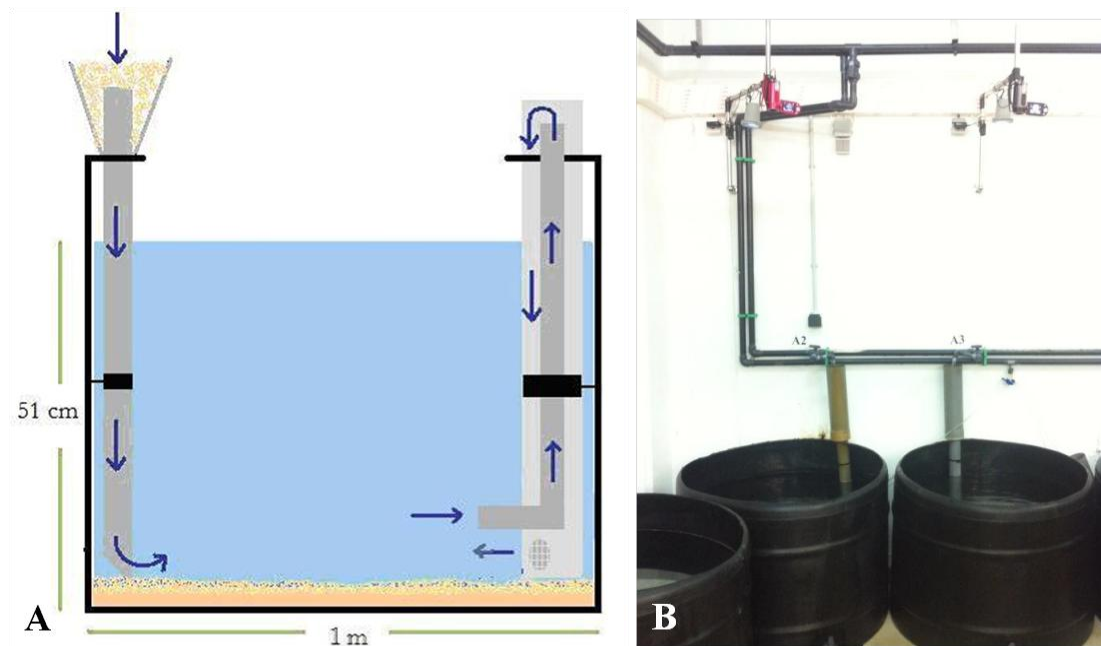
Για τη μελέτη της διατροφικής προτίμησης του *C. seguenzae* χρησιμοποιήθηκαν 4 είδη, το καθένα εκ των οποίων ανήκε σε μία από τις κλάσεις ζώων που οι τρίτωνες δύνανται να καταναλώσουν, βάση των αποτελεσμάτων της προηγούμενης ενότητας (2.1). Οι τροφές αυτές ήταν ένα εχινόδερμο (το ολοθούριο *Holothuria polii*), ένα ψάρι (*Boops boops*), ένα κεφαλόποδο (*Loligo opalescens*) και η γαρίδα (*Penaeus kerathurus*). Ιδανικά, το επιθυμητό εχινόδερμο θα ήταν ένα είδος αστερία, αλλά δεν κατέστη δυνατή η συλλογή των ποσοτήτων που απαιτούνταν. Τα

ολοθούρια συλλέχθηκαν ζωντανά από τις ακτές της Κρήτης ενώ τα άλλα είδη αγοράστηκαν φρέσκα ή κατεψυγμένα από την τοπική αγορά. Όλες οι τροφές αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-20°C) σε μορφή μερίδων $68,4 \pm 10\text{g}$ (περίπου 10 % σωματικού βάρους των τριτώνων) σχεδόν διπλάσια από την ημερήσια τιμή της *ad libidum* κατανάλωσης (Doxa et al., 2012) ώστε η ποσότητα τροφής να μην αποτελείσει περιοριστικό παράγοντα. Οι τροφές μεταφέρονταν από τη βαθιά κατάψυξη στη συντήρηση (2-4 °C) για απόψυξη 24h πριν την χορήγησή της.

2.2.2.3 Πειραματική διαδικασία

Επιλέχθηκαν 15 άτομα από τον πειραματικό πληθυσμό (ενότητα 2.1.2.1) με κριτήρια επιλογής την ομοιομορφία μεγέθους ($641.9 \pm 83.1\text{g}$ μέσο βάρος (W) και $22.4 \pm 1.4\text{cm}$ μήκος κελύφους (SL)) και κοινό ιστορικό σε συνθήκες αιχμαλωσίας (αιχμαλωτίστηκαν την ίδια περίοδο και διατηρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες). Κάθε άτομο υποβλήθηκε σε τρεις δοκιμές προτίμησης, και κάθε δοκιμή απείχε χρονικά από την επόμενη κατά μία εβδομάδα (συνολική διάρκεια πειραματικής διαδικασίας 4 εβδομάδες). Τα ζώα παρέμειναν νηστικά μία εβδομάδα πριν από κάθε δοκιμή. Το διάστημα μεταξύ των δοκιμών, τα άτομα διατηρήθηκαν ανά τρία σε 5 ενυδρεία των 150L, σε περιβαλλοντικές συνθήκες όμοιες με αυτές που περιγράφονται στην ενότητα 2.1 και θερμοκρασία $23 \pm 0.4^\circ\text{C}$.

Για τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τρεις μαύρες κυλινδρικές δεξαμενές χωρητικότητας 500L, επιστρωμένες με χαλίκι, που διέθεταν ανοιχτό κύκλωμα παροχής νερού (90%/h) και αερισμό (Εικ. 8A,B). Κατά τη διάρκεια των δοκιμών το pH, η θερμοκρασία, η αλατότητα και ο κορεσμός του νερού σε οξυγόνο παρέμειναν σταθερά στο 7.5 ± 0.05 , $23.0^\circ\text{C} \pm 0.4^\circ\text{C}$, 35‰, και 90% αντίστοιχα. Εφαρμόστηκε τεχνητή φωτοπερίοδος 12L:12D ενώ κατά τη διάρκεια της φωτόφασης ο φωτισμός προερχόταν από λάμπες φθορίου 60 W με την ένταση του φωτός να ανέρχεται στα 128 LUX. Για να γίνει δυνατή η καταγραφή της συμπεριφοράς των τριτώνων κατά τη διάρκεια της σκοτόφασης μια λευκή λάμπα 1.8W Led (24 Led GU10, 1,8W) παρείχε φως έντασης μικρότερης των 20 lux. Πάνω από κάθε δεξαμενή, εκτός από το φωτιστικό Led, τοποθετήθηκε και βάση για την προσάρτηση βιντεοκάμερας (Samsung, SMX-F34) (Εικ. 8B). Η συγκεκριμένη βιντεοκάμερα επιλέχθηκε επειδή έχει ενσωματωμένη τη δυνατότητα καταγραφής σε ελλειπτικό χρόνο (time-lapse recording).



Εικ. 8: Α) Απεικόνιση της πειραματικής δεξαμενής. Το νερό εισέρχεται στη δεξαμενή μέσω σωλήνα (αριστερά) από τον πυθμένα της δεξαμενής ενώ στα δεξιά είναι τοποθετημένο ένα σύστημα airlift μέσα σε έναν δεύτερο σωλήνα προς αποφυγή της διατάραξης της επιφάνειας του νερού Β) Απεικόνιση του συστήματος φωτισμού και καταγραφής που είχε τοποθετηθεί πάνω από κάθε πειραματική δεξαμενή. (από Κουρεπίνη, 2009)

Η κάθε δοκιμή περιλάμβανε την τοποθέτηση γνωστής ποσότητας από το κάθε είδος στην περίμετρο της δεξαμενής, απέχοντας ίσα τόξα (90°) μεταξύ τους και 50cm από το κέντρο, στο οποίο τοποθετούνταν το εκάστοτε δοκιμαζόμενο άτομο (Εικ. 9). Παράλληλα, με τη χρήση της βιντεοκάμερας (Samsung, SMX-F34) που ήταν τοποθετημένη πάνω από την κάθε δεξαμενή καταγραφόταν η διαδικασία εύρεσης και κατανάλωσης της τροφής. Τα ζώα αφήνονταν να καταναλώσουν την ποσότητα της τροφής/τροφών που επέλεξαν για διάστημα 23 ωρών. Έπειτα τα υπολείμματα των τροφών απομακρύνονταν και υπολογιζόταν η ποσότητα που καταναλώθηκε από κάθε είδος. Χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της βιοχημικής ανάλυσης των τροφών για να υπολογιστεί η ποσότητα των θρεπτικών που περιείχαν οι τροφές που καταναλώθηκαν. Από την ανάλυση των βίντεο προέκυψε η σειρά προτεραιότητας με την οποία οι τρίτωνες καταναλώναν τα διάφορα είδη.



Εικ. 9: Πειραματικός σχεδιασμός προσδιορισμού διατροφικής προτίμησης. Στο κέντρο της δεξαμενής είναι τοποθετημένο ένα άτομο *Charonia seguenzae* και στην περίμετρο αυτής (50cm ακτίνα) οι 4 τροφές.

2.2.2.4 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν για κανονικότητα (Kolmogorov–Smirnov test) και ισότητα των διασπορών (Bartlett’s test of sphericity). Εφόσον πληρούνταν οι προϋποθέσεις πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς (1-way ANOVA), η οποία δίνει στοιχεία για το αν οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών διαφορετικών ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές ή όχι. Όταν δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις για την ανάλυση διασποράς, πραγματοποιούνταν ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis. Όταν οι μέσες τιμές διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) χρησιμοποιούνταν το Tukey’s test (HSD test) για την ανάλυση των διαφορών.

2.2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.3.1 Βιοχημική σύσταση τροφών

Τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας των τροφών που εξετάστηκαν στις ενότητες 2.2 και 2.3 σε θρεπτικά (πρωτεΐνες, ολικά λίπη, υδατάνθρακες) και σε ενέργεια παρουσιάζονται συνοπτικά στους Πίνακες 2 και 3. Η τροφή με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, 21.26% είναι το ψάρι (*Boops boops*) και ακολουθούν οι γαρίδες *Penaeus kerathurus* και *Parapenaeus longirostris* με 19.8% και 16.99% αντίστοιχα, το ολοθούριο με 16.51% και τα κεφαλόποδα *Nototodarus sloanii* και *Loligo opalescens* με 16.56% και 15.18%. Η περιεκτικότητα των τροφών σε ολικά λίπη κυμάνθηκε από 0.4% για το *P. keranthurus* έως 2.25% για το *H. polii*, ενώ η τροφή με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ήταν το *L. opalescens* με 2.68%. Από ενεργειακής άποψης, η τροφή με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ήταν το *B. boops* με 102.29 Kcal/100g νωπού βάρους και ακολουθούν το *L. opalescens* με 87.5Kcal, το *H. polii* με 86.29Kcal, το *P. keranthurus* με 85.6 Kcal, το *P. longirostris* με 80.83 Kcal και τέλος το *N. sloanii* με 74.97 Kcal.

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα (%) των ειδών που εξετάστηκαν σε πρωτεΐνες, λίπη και στους υδατάνθρακες.

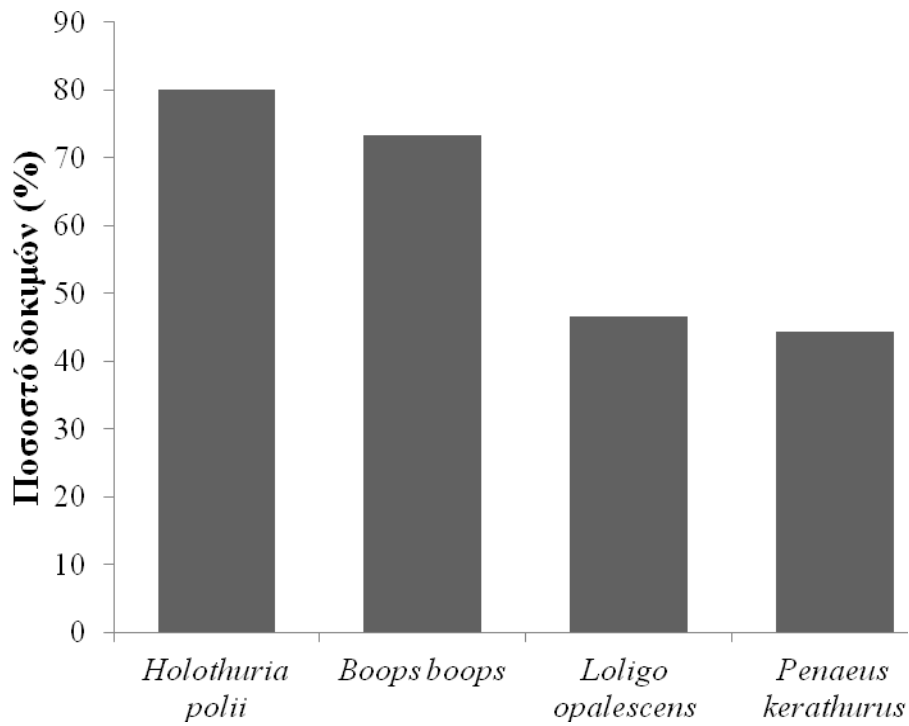
Είδη	Θρεπτικά (%)		
	Πρωτεΐνες	Ολικά λίπη	Υδατάνθρακες
<i>Holothuria polii</i>	16.51	2.25	0.00
<i>Boops boops</i>	21.26	1.91	0.02
<i>Loligo opalescens</i>	15.18	1.79	2.68
<i>Nototodarus sloanii</i>	16.56	0.97	0.00
<i>Penaeus kerathurus</i>	19.80	0.40	0.70
<i>Parapenaeus longirostris</i>	16.99	1.43	0.00

Πίνακας 3: Περιεκτικότητα των ειδών που εξετάστηκαν σε ενέργεια η οποία αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες, στα λίπη και στους υδατάνθρακες. Οι τιμές αντιστοιχούν σε Kcal ανά 100g νωπού βάρους τροφής.

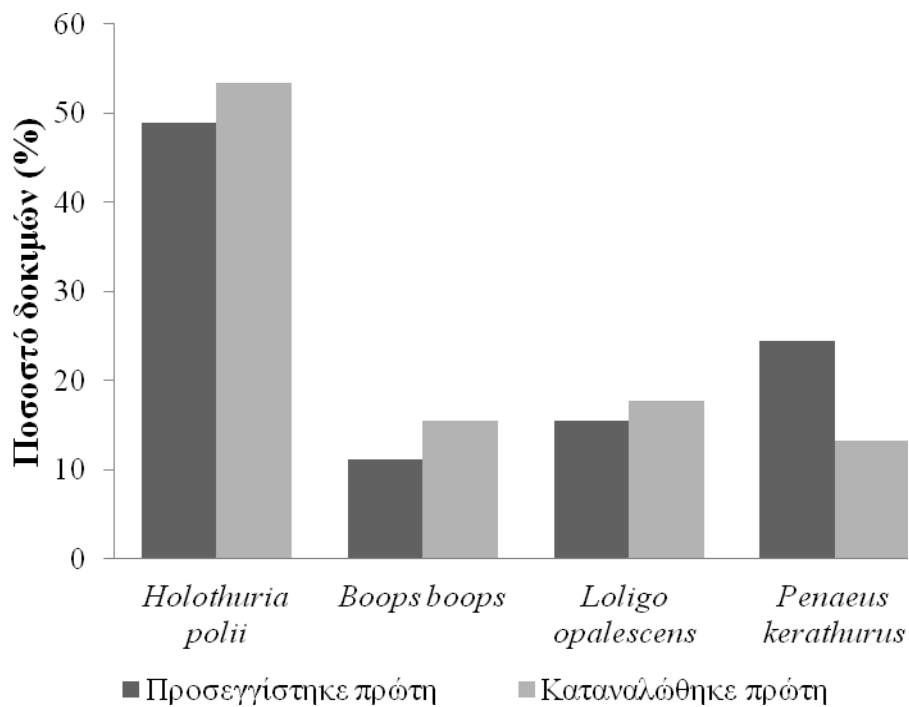
Είδη	Ενέργεια (Kcal/100g νωπού βάρους)			
	Πρωτεΐνες	Ολικά λίπη	Υδατάνθρακες	Σύνολο
<i>Holothuria polii</i>	66.03	20.26	0.00	86,29
<i>Boops boops</i>	85.04	17.17	0.08	102,29
<i>Loligo opalescens</i>	60.71	16.07	10.71	87,50
<i>Nototodarus sloanii</i>	66.24	8.73	0.00	74,97
<i>Penaeus kerathurus</i>	79.20	3.60	2.80	85,60
<i>Parapenaeus longirostris</i>	67.96	12.87	0.00	80,83

2.2.3.2 Επιλογή τροφής

Η τροφή που καταναλώθηκε στις περισσότερες δοκιμές ήταν τα ολοθούρια (*H. polii*) με ποσοστό 80% και ακολούθησαν το ψάρι (*B. boops*) με 73.33% , το καλαμάρι (*L. opalescens*) με 46.66% και οι γαρίδες (*P. kerathurus*) 44.44% (Εικ. 10). Από αυτές, τα ολοθούρια ήταν η τροφή που προσεγγίστηκε πρώτη από τους τρίτωνες στο 48.8% των δοκιμών, οι γαρίδες στο 24.44%, το καλαμάρι στο 15.55% και το ψάρι στο 11.11% (Εικ. 11). Από την ανάλυση των βίντεο και τα αποτελέσματα της κατανάλωσης τροφής προέκυψε ότι οι τρίτωνες σε κάποιες περιπτώσεις δεν κατανάλωναν το είδος που προσέγγιζαν πρώτο, αλλά άλλαζαν πορεία και κατευθύνονταν σε άλλο. Σε 5 δοκιμές, ενώ οι γαρίδες προσεγγίστηκαν πρώτες δεν ήταν αυτές που καταναλώθηκαν πρώτες. Έτσι, ως προς την τροφή που καταναλώθηκε πρώτη, τα ολοθούρια εξακολουθούν να εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό (53.33%), ενώ ακολουθούν το καλαμάρι (17.77%), το ψάρι (15.55%) και οι γαρίδες (13.33%).



Εικ. 10: Ποσοστό (%) των δοκιμών στις οποίες καταναλώθηκε το κάθε είδος τροφής.



Εικ. 11: Ποσοστό (%) των δοκιμών στις οποίες το κάθε είδος τροφής α) προσεγγίστηκε και β) καταναλώθηκε πρώτο.

Οι τρίτωνες κατανάλωσαν περισσότερα από ένα είδη τροφών σε 84.44% των δοκιμών, καταναλώνοντας ή δύο σε 37.78%, ή τρεις σε 33.33% ή και όλα τα είδη σε 13.33% των δοκιμών. Στην περίπτωση που καταναλώθηκε ένα μόνο είδος τροφής αυτό ήταν τα ολοθούρια και το ψάρι σε ποσοστό 11.11% και 4.44% επί των δοκιμών αντίστοιχα. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4) παραθέτονται λεπτομερώς τα ποσοστά κατανάλωσης όλων των συνδυασμών. Ο συνδυασμός με το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης είναι το ολοθούρια-ψάρι με 15.56%.

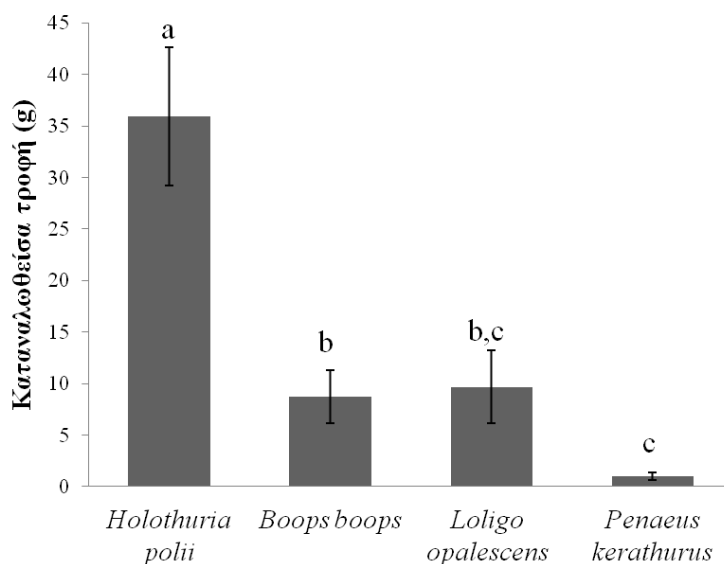
Πίνακας 4: Αριθμός και Ποσοστό (%) δοκιμών κατά τις οποίες καταναλώθηκαν 1,2,3 ή 4 είδη τροφών και οι συνδυασμοί αυτών. B: *Boops boops*, H: *Holothuria polii*, L: *Loligo opalescens*, P: *Penaeus kerathurus*.

Αριθμός τροφών	Είδος τροφής	Αριθμός δοκιμών	Ποσοστό δοκιμών (%)
1 είδος	B	2	4.44
	H	5	11.11
2 είδη	HB	7	15.56
	HL	2	4.44
	BL	4	8.89
	BP	1	2.22
	HP	3	6.67
	LBP	2	4.44
3 είδη	HBL	5	11.11
	HLP	2	4.44
	HBP	6	13.33
4 είδη	HBLP	6	13.33

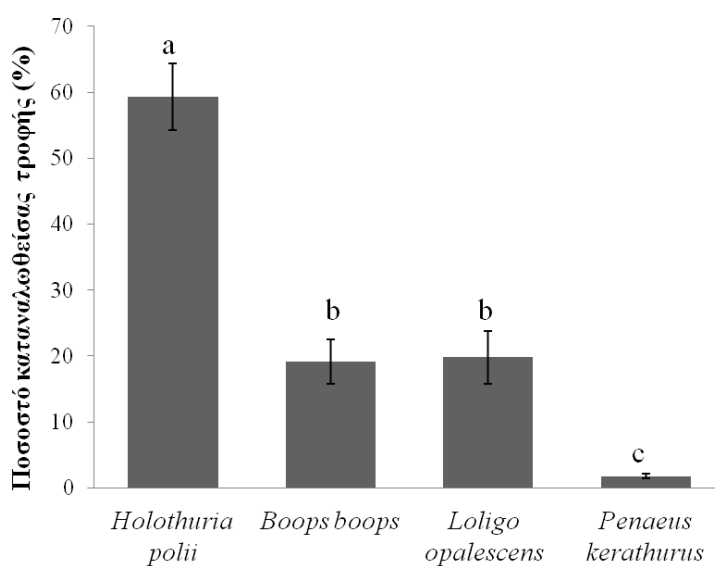
2.2.3.3 Κατανάλωση τροφής

Η τροφή που οι τρίτωνες κατανάλωσαν σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι τα ολοθούρια ($35.94 \pm 6.71\text{g}$ ανά δοκιμή), ακολουθούν το καλαμάρι ($9.68 \pm 3.52\text{g}$), το ψάρι ($8.7 \pm 2.57\text{g}$) και οι γαρίδες ($0.96 \pm 0.17\text{g}$ ανά δοκιμή). Οι διαφορές στη μέση κατανάλωση είναι στατιστικά σημαντικές (K-W, $p < 0.001$) με τα ολοθούρια να διαφέρουν από όλα τα άλλα είδη και τις γαρίδες να διαφέρουν από το ψάρι (Tukey test, $p < 0.05$) (Εικ. 12). Ανάγοντας την ποσότητα που καταναλώθηκε από κάθε είδος σε ποσοστό(%) επί του συνόλου της τροφής που καταναλώθηκε παρατηρείται ότι τα

ολοθούρια αποτελούν το $59.31 \pm 5.02\%$ της διατροφής των τριτώνων και ακολουθούν το καλαμάρι και το ψάρι με $19.77 \pm 4\%$ και $19.15 \pm 3.4\%$ αντίστοιχα με τελευταίες τις γαρίδες με $1.76 \pm 0.36\%$ (Εικ. 13). Οι παρατηρούμενες διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές (ANOVA, $p < 0.001$) με τα ολοθούρια και τις γαρίδες να διαφέρουν από όλες τις άλλες τροφές (Tukey's test, $p < 0.01$).

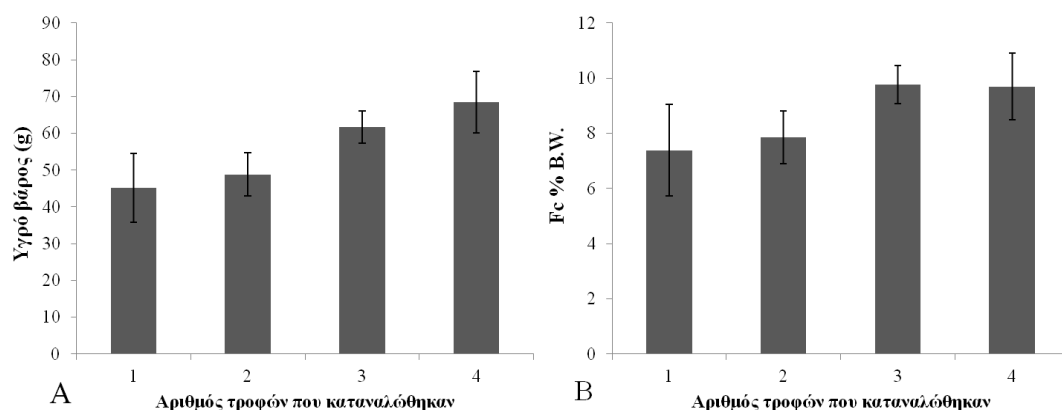


Εικ. 12: Ποσότητα καταναλωθείσας τροφής (g) ανά είδος τροφής. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).



Εικ. 13: Ποσοστό (%) καταναλωθείσας τροφής επί της συνολικής ποσότητας που καταναλώθηκε ανά είδος τροφής. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.01$).

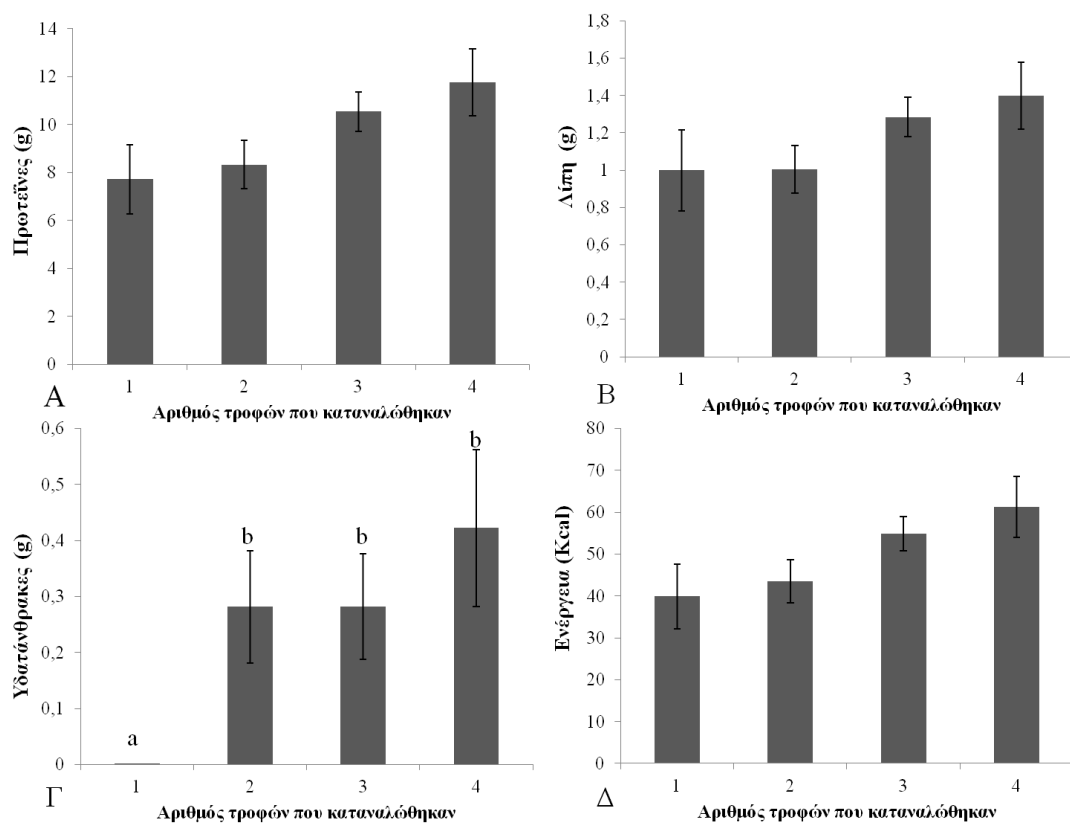
Η συνολική ποσότητα καταναλωθείσας τροφής επίσης παρουσίασε αύξηση ανάλογα με τον αριθμό των ειδών που καταναλώνονταν κάθε φορά. Έτσι, όταν οι τρίτωνες κατανάλωναν 4 είδη η συνολική ποσότητα έφτανε τα 68.52 ± 8.38 g σε υγρό βάρος ενώ όταν κατανάλωναν τρία, δύο και ένα είδος η συνολική καταναλωθείσα ποσότητα έφτανε τα 61.72 ± 4.42 g , 48.81 ± 5.91 g και 45.24 ± 9.37 g αντίστοιχα σε υγρό βάρος (Εικ. 14Α). Την ίδια τάση παρουσίασε και η καταναλωθείσα ποσότητα τροφής σε σχέση με το σωματικό βάρος των τριτώνων (Fc% B.W.), η οποία κυμάνθηκε μεταξύ $7.39 \pm 1.66\%$ (όταν καταναλώθηκε ένα είδος τροφής) και $9.7 \pm 1.21\%$ (όταν καταναλώθηκαν τέσσερα είδη τροφής, Εικ. 14B). Όμως οι παρατηρούμενες διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (ANOVA $p=0.104$ και $p=0.298$ αντίστοιχα).



Εικ. 14: Α) Συνολικά καταναλωθείσα τροφής (g, σε υγρό βάρος) και Β) ποσοστό (%) καταναλωθείσας τροφή επί του σωματικού βάρους των τριτώνων ανά αριθμό ειδών που καταναλώθηκαν. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα.

Η ποσότητα πρωτεϊνών που περιείχε η τροφή που κατανάλωσαν οι τρίτωνες κυμάνθηκε από 7.72 ± 1.45 g έως 11.76 ± 1.39 g (κατανάλωση ενός και τεσσάρων ειδών αντίστοιχα, Εικ. 15Α). Παρόμοια τάση παρουσίασαν τα λίπη (Εικ. 15B), η κατανάλωση των οποίων κυμάνθηκε μεταξύ 1 ± 0.22 g και 1.4 ± 0.18 g, και οι υδατανθράκες (Εικ. 15Γ) η κατανάλωση των οποίων κυμάνθηκε από 0.0004 ± 0.0004 g έως 0.42 ± 0.14 g για μία και τέσσερις τροφές αντίστοιχα. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την κατανάλωση πρωτεϊνών και λιπών δεν είναι στατιστικά σημαντικές (ANOVA, $p=0.093$ και $p=0.190$ αντίστοιχα) σε αντίθεση με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν για τους υδατάνθρακες (K-W, $p=0.003$) όπου η ποσότητα υδατάνθρακων που καταναλώθηκε όταν επιλέχτηκε μία τροφή διέφερε από

αυτή που υπολογίστηκε όταν καταναλώθηκαν δύο, τρεις και τέσσερις τροφές (Dunn's method, $p < 0,05$). Η περιεκτικότητα σε ενέργεια της τροφής που καταναλώθηκε κυμάνθηκε από 39.87 ± 7.76 Kcal όταν καταναλώθηκε ένα είδος τροφής έως 61.31 ± 7.32 Kcal όταν καταναλώθηκαν και τα τέσσερα (Εικ. 15Δ). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην ενέργεια, δεν είναι στατιστικά σημαντικές (ANOVA, $p = 0.086$).



Εικ. 15: Περιεκτικότητα της τροφής ανά αριθμό τροφών που καταναλώθηκαν σε Α) ολικές πρωτεΐνες (g), Β) ολικά λίπη (g), Γ) υδατάνθρακες (g) και Δ) ενέργεια (Kcal) . Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).

2.2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι τρίτωνες έδειξαν έντονη προτίμηση για τα ολοθούρια τα οποία επελέγησαν στην πλειονότητα των δοκιμών, καταναλώθηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες και απετέλεσαν το μεγαλύτερο σε ποσοστό έδεσμα του γεύματος των τριτώνων. Το ψάρι και το καλαμάρι ακολούθησαν σε προτίμηση ενώ η τροφή με τη μικρότερη κατανάλωση ήταν οι γαρίδες. Σημαντικό αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης είναι η τάση των τριτώνων, υπό συνθήκες αιχμαλωσίας, παρά την έκφραση συγκεκριμένων τροφικών προτιμήσεων, να καταλήγουν να τρέφονται με μία ποικιλία τροφών.

Τα ολοθούρια αποτελούν μέρος της φυσικής διατροφής των τριτώνων (Percharde, 1972, Russo *et al.*, 1990), και ο βαθμός αποδοχής των τριτώνων για αυτά είναι πολύ υψηλός (Doxa *et al.*, 2012). Στην παρούσα μελέτη, ήταν το είδος που προσεγγίστηκε και καταναλώθηκε πρώτο και επιλέχθηκε στην πλειονότητα των δοκιμών. Απέτελεσαν το μεγαλύτερο ποσοστό της διαίτας των τριτώνων φθάνοντας το 59.31% του γεύματός τους ενώ η ποσότητα τροφής που καταλάωναν ($35.94 \pm 6.7g$) ήταν αντίστοιχη με την ποσότητα που καταναλώθηκε όταν οι τρίτωνες τρέφονταν μόνο με ολοθούρια ($38.86 \pm 5.5g$, Doxa *et al.*, 2012). Το ψάρι, αν και επιλέχθηκε σε μεγάλο ποσοστό των δοκιμών, καταναλώθηκε σε μικρότερη ποσότητα από τα ολοθούρια καθώς και από την ποσότητα τροφής που καταλάωναν οι τρίτωνες όταν τρέφονταν μόνο με ψάρι (Doxa *et al.*, 2012, 2013). Το καλαμάρι, αν και επιλέχθηκε σε μικρότερο ποσοστό δοκιμών, εμφάνισε την ίδια κατανάλωση με το ψάρι σε ποσότητες αντίστοιχες με αυτές που καταναλώθηκαν όταν οι τρίτωνες τρέφονταν μόνο με ένα είδος καλαμαριού (Doxa *et al.*, 2012, 2013). Οι γαρίδες, αν και είχαν πολύ καλή αποδοχή (επιλέχθηκαν στο 44.4% των δοκιμών) καταναλώθηκαν σε ποσότητες περίπου 10 φορές μικρότερη από αυτές που μετρήθηκαν παρουσία ενός είδους τροφής (Doxa *et al.*, 2012, 2013) αποτελώντας μόλις το 1.76% του ημερήσιου γεύματος των τριτώνων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι ενώ οι γαρίδες ήταν η τροφή που εμφάνισε το υψηλότερο ποσοστό πρώτης προσέγγισης μετά τα ολοθούρια, σε πέντε περιπτώσεις δεν καταναλώθηκαν. Οι τρίτωνες τις δοκίμασαν και κατευθύνθηκαν στην επόμενη τροφή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι ενώ η μυρωδιά προσελκύει τους τρίτωνες, δεν τους αρέσει η γεύση τους. Έτσι, όταν έχουν την δυνατότητα επιλογής μεταξύ διαφόρων ειδών καταναλώνουν μικρότερη

ποσότητα σε σχέση με την ποσότητα που καταναλώνουν όταν οι γαρίδες είναι η μοναδική τροφή που χορηγείται (παρούσα μελέτη, Doxa *et al.*, 2012, 2013).

Οι τρίτωνες στην πλειονότητα των δοκιμών επέλεξαν να τραφούν με περισσότερες της μίας τροφές, χωρίς όμως ο αριθμός των τροφών που καταναλώθηκε να επηρεάζει σημαντικά τις ενεργειακές απολαβές των τριτώνων. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη κάλυψη των διατροφικών τους αναγκών σε μακρο και μικροστοιχεία. Η δυνατότητα αυτή των τριτώνων ομοιάζει με αντίστοιχες παρατηρήσεις σε κάποια είδη ψαριών (π.χ. *Oreochromis niloticus*, *Sparus aurata*) που μπορούν να διατηρήσουν σταθερά τα επίπεδα ενέργειας που προσλαμβάνουν, μέσω επιλογής θρεπτικών από διαφορετικές, ελλιπείς δίαιτες (Fortes-Silva & Sánchez-Vázquez, 2012, Fortes-Silva *et al.*, 2012, Montoya *et al.*, 2012).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβάλουν στην κατανόηση των διατροφικών απαιτήσεων των τριτώνων και στην βελτιστοποίηση των συνθηκών διατήρησης υπό αιχμαλωσία. Ενώ είναι έκδηλη η προτίμηση για ολοθούρια, αυτά δεν αποτελούν την τροφή με την οποία τρέφονται αποκλειστικά οι τρίτωνες αλλά προτιμούν να τρέφονται με ποικιλία τροφών. Η παροχή ποικιλίας τροφών και συνεπώς η δυνατότητα εκδήλωσης προτίμησης που είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ευζωία (welfare) των ζώων (Swaissgood, 2007), φαίνεται πως σχετίζεται άμεσα με την δυνατότητα των τριτώνων να συμπληρώνουν τη διατροφή τους με απαραίτητα για αυτά θρεπτικά στοιχεία.

2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ποσότητα τροφής που καταναλώνεται

2.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η θερμοκρασία επηρεάζει όλες τις βιολογικές λειτουργίες των θαλάσσιων οργανισμών. Απόδειξη αυτού είναι ότι μέχρι το 1993 είχαν πραγματοποιηθεί 3453 μελέτες που αφορούσαν στην επίδραση της θερμοκρασίας στα ασπόνδυλα και στα ψάρια (Kennedy & Mikulski, 1993), ενώ ο αριθμός αυτός σήμερα υπερβαίνει τις 4500. Έχει αποδειχθεί ότι η θερμοκρασία επιδρά στην εξάπλωση (π.χ. Allee, 1923a,b, Broekhuysen, 1940, MacKay, 1943, Cerame-Vivas & Gray, 1966), τη συμπεριφορά και τη δραστηριότητα (π.χ. Bullock, 1955, Naylor, 1963, Reynolds & Casterlin, 1979, Casterlin & Reynolds, 1980, McLachlan & Young, 1982, DeSmet, 1985, McBride *et al.*, 1989, Svetlichnyi, 1989, Widdows, 1973), την ανάπτυξη (π.χ. Bourne & Smith, 1972, Landry, 1975, Akesson, 1977, Branford, 1978a,b, Dawirs, 1979, Al-Habbib & Grainger, 1981, 1983, Clarke, 1982, Anger, 1983, 1991, Palmegiano & D'Apote, 1983, Pechenik, 1984a,b, Lima & Pechenik, 1985, Blaszkowski & Moreira, 1986, Dawirs & Dietrich, 1986, Bhaud, 1988, Jamieson & Burns, 1988, Hann, 1989, Al-Tikrity & Grainger 1990, Charmantier & Mounet, 1992), τη διατροφή (π.χ. Barnes & Barnes, 1975, Dawirs & Dietrich, 1986, Aranda *et al.*, 1989, Bernardi, 1990, Pechenic *et al.*, 1990, Delrioportilla *et al.*, 1992) την αύξηση (π.χ. Davis & Calabrese, 1969, Almada-Villela *et al.*, 1982, Beaumont & Budd, 1982, Laughlin, 1983, Cadman & Weinstein, 1988, Forsythe & Hanlon, 1988, Aranda *et al.*, 1989, Britz *et al.*, 1997, Garcia-Esquevel *et al.*, 2007, Miranda *et al.*, 2009, Green *et al.*, 2011, Noble *et al.*, 2013) την αναπαραγωγή και φυλετική διαφοροποίηση των θαλάσσιων οργανισμών (π.χ. Thorson, 1950, Ginsburger-Vogel, 1975, McMahan, 1975, Heip & Smol, 1976, Aiken & Waddy, 1989, Morse, 1981, Abdullahi, 1990, Browne & Wanigasekere, 2000, Halsband-Lenk *et al.*, 2002). Το *C. seguenzae* είναι ένα είδος που εξαπλώνεται στην Ανατολική Μεσόγειο όπου παρατηρείται έντονη εποχική διακύμανση στην επιφανειακή θερμοκρασία της θάλασσας. Στο Αιγαίο αν το εύρος των τιμών κυμαίνεται από 8 °C στο Βόρειο Αιγαίο το χειμώνα έως 26 °C το καλοκαίρι στο Νοτιοανατολικό Αιγαίο η μέση διακύμανση της θερμοκρασίας είναι από 14 °C το

χειμώνα έως 24 °C το καλοκαίρι (Poulos *et al.*, 1997, Shaltout & Omstedt, 2014). Αντίστοιχες μελέτες στη Νοτιοανατολική Μεσόγειο, στην θάλασσα της Λεβαντίνης, αναφέρουν ότι η εποχική διακύμανση της θερμοκρασίας της θάλασσας είναι μικρότερη και κυμαίνεται από 16.8 °C το χειμώνα έως 23.06 °C το καλοκαίρι (Shaltout & Omstedt, 2014). Έτσι λοιπόν οι έντονες θερμοκρασιακές αλλαγές φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ζωή των τριτόνων και στόχος του τρίτου μέρους αυτής της ενότητας είναι η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας (17, 20, 23°C) στην διατροφή των τριτόνων.

2.3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.2.1 Πειραματικές τροφές

Χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη τροφών μεταξύ αυτών που εξετάστηκαν στην ενότητα 2.1: τα ολοθούρια (*Holothuria polii*), το ψάρι (*Boops boops*) και το καλαμάρι (*Nototodarus sloanii*). Τα ολοθούρια συλλέχθηκαν ζωντανά από τις ακτές της Κρήτης ενώ τα άλλα είδη αγοράστηκαν φρέσκα ή κατεψυγμένα από την τοπική αγορά. Όλες οι τροφές αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-20°C) σε μορφή μερίδων ($68,4 \pm 10\text{g}$: περίπου 10 % του σωματικού βάρους των τριτώνων), βάρους σχεδόν διπλάσιου από την ημερήσια τιμή της *ad libidum* κατανάλωσης (Doxa *et al.*, 2012) ώστε η ποσότητα τροφής να μην αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα. Οι τροφές μεταφέρονταν από τη βαθιά κατάψυξη στη συντήρηση ($2-4^{\circ}\text{C}$) για απόψυξη 24h πριν την χορήγησή τους.

2.3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Επιλέχθηκαν 24 άτομα από τον πειραματικό πληθυσμό (ενότητα 2.1.2.1) με κριτήρια επιλογής την ομοιομορφία μεγέθους ($636 \pm 67.74\text{g}$ μέσο βάρος (W) και $22.65 \pm 1.47\text{cm}$ μήκος κελύφους (SL)) και κοινό ιστορικό σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Για τις δοκιμές, τα άτομα τοποθετήθηκαν ατομικά σε ενυδρεία 150L, σε περιβαλλοντικές συνθήκες όμοιες με αυτές που περιγράφονται στην ενότητα 2.1, σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες $17.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$, $20.2 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ και $23.15 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$. Οχτώ άτομα τοποθετήθηκαν σε κάθε θερμοκρασία ενώ η κάθε τροφή δοκιμάστηκε σε όλα τα άτομα και για περίοδο 45 ημερών, με περίοδο νηστείας διάρκειας 2 εβδομάδων μεταξύ των διαφορετικών τροφών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, σε κάθε ζώο χορηγούταν γνωστή ποσότητα αποψυγμένης τροφής κάθε 3 ημέρες, και αφηνόταν να την καταναλώσει για 48 ώρες. Έπειτα συλλέγονταν και ζυγίζονταν τα υπολείμματα τροφής. Υπολογίστηκε η κατανάλωση τροφής ανά τάισμα, ο ημερήσιος ρυθμός ταιίσματος (DFR) και ο ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR) σύμφωνα με τους τύπους:

$$DFR = F * 100 / \{ ([B_{\text{τελ}} + B_{\text{αρχ}}] / 2) * (t_2 - t_1) \}$$

$$SGR = [\ln(B_{\text{τελ}}) - \ln(B_{\text{αρχ}})] * 100 / (t_2 - t_1)$$

Όπου:

F = Βάρος τροφής (g)

B_{αρχ} = Αρχικό βάρος τρίτων (g)

B_{τελ} = Τελικό βάρος τρίτων (g)

t₁ = Αρχικός χρόνος (ημέρες)

t₂ = Τελικός χρόνος (ημέρες)

2.3.2.3 Στατιστική ανάλυση

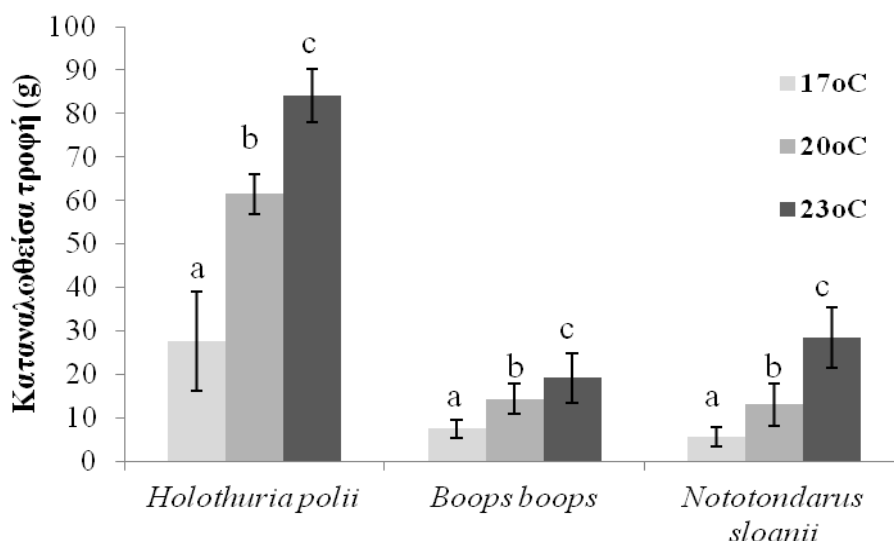
Τα δεδομένα αναλύθηκαν για κανονικότητα (Kolmogorov–Smirnov test) και ισότητα των διασπορών (Bartlett's test of sphericity). Επειδή δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις για διπαραγοντική ανάλυση διασποράς (2-way ANOVA) ούτε και μετά από μετασχηματισμούς των δεδομένων, πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς (1-way ANOVA) για την επίδραση της θερμοκρασίας σε κάθε είδος τροφής. Όταν οι μέσες τιμές διέφεραν στατιστικά σημαντικά (p<0.05) χρησιμοποιούταν το Holm-Sidak test για την ανάλυση των διαφορών.

2.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

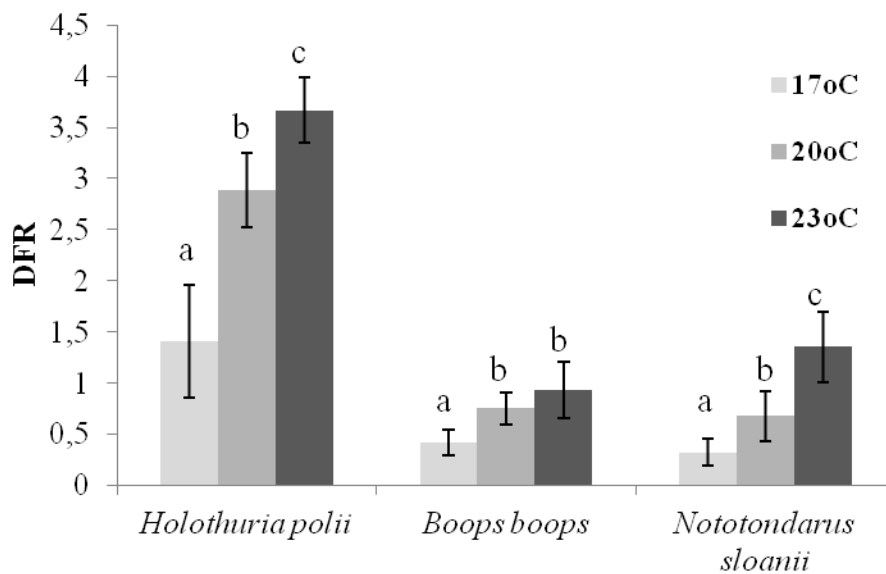
2.3.3.1 Κατανάλωση τροφής

Η θερμοκρασία επέδρασε στατιστικά σημαντικά (ANOVA, $p < 0.001$) στην κατανάλωση και των τριών τροφών. Ακολουθήθηκε το ίδιο πρότυπο με τη μικρότερη καταναλωθείσα ποσότητα τροφής να παρατηρείται στους 17°C και τη μεγαλύτερη στους 23 °C ενώ οι διαφορές μεταξύ όλων των θερμοκρασιών ήταν στατιστικά σημαντικές (Εικ. 16). Οι τιμές κυμάνθηκαν από $27.64 \pm 11.47\text{g}$ (17°C) έως $84.1 \pm 6.04\text{g}$ (23°C) για τα ολοθούρια, από $7.39 \pm 2.2\text{g}$ (17°C) έως $19.19 \pm 5.68\text{g}$ (23°C) για το ψάρι και από $5.62 \pm 2.26\text{g}$ (17°C) έως $28.44 \pm 7.03\text{g}$ (23°C) για το καλαμάρι.

Αντίστοιχη ήταν η επίδραση της θερμοκρασίας (ANOVA, $p < 0.001$) και στον ρυθμό κατανάλωσης τροφής (DFR). Για κάθε τροφή ο μικρότερος ρυθμός κατανάλωσης τροφής παρατηρήθηκε στους 17°C και ο μεγαλύτερος στους 23°C με τις διαφορές ανάμεσα σε όλες τις θερμοκρασίες να είναι στατιστικά σημαντικές (Εικ. 17) εκτός από τους 20 και 23 °C για το ψάρι. Ο DFR κυμάνθηκε από $1.41 \pm 0.56\%$ (17°C) έως $3.67 \pm 0.31\%$ (23°C) για τα ολοθούρια, από $0.42 \pm 0.12\%$ (17°C) έως $0.93 \pm 0.28\%$ (23°C) για το ψάρι και από $0.32 \pm 0.13\%$ (17°C) έως $1.35 \pm 0.34\%$ (23°C) για το καλαμάρι.



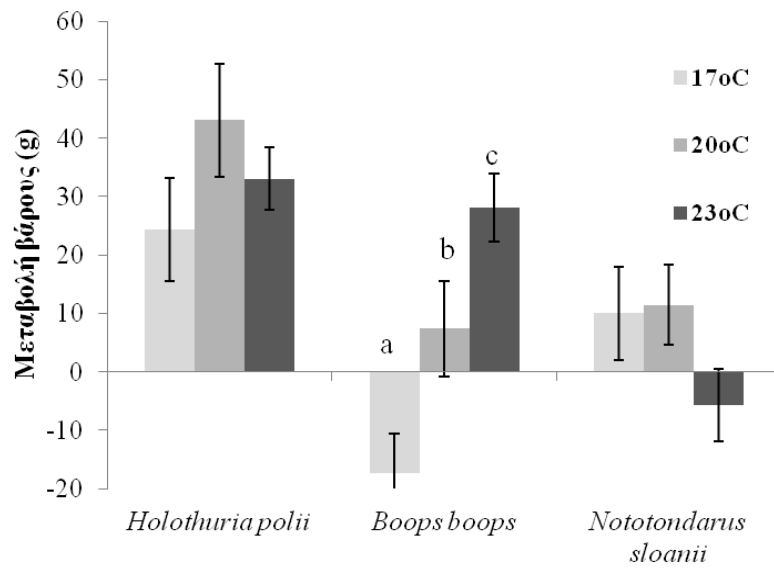
Εικ. 16: Ποσότητα τροφής (g) που καταναλώνουν οι τρίτωνες *C. seguenzae* σε τρεις θερμοκρασίες (17, 20 και 23 °C) ανά είδος τροφής (*H. polii*, *B. boops*, *N. sloanii*). Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί γραμματικοί δείκτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις θερμοκρασίες ($p < 0.05$) για την ίδια τροφή.



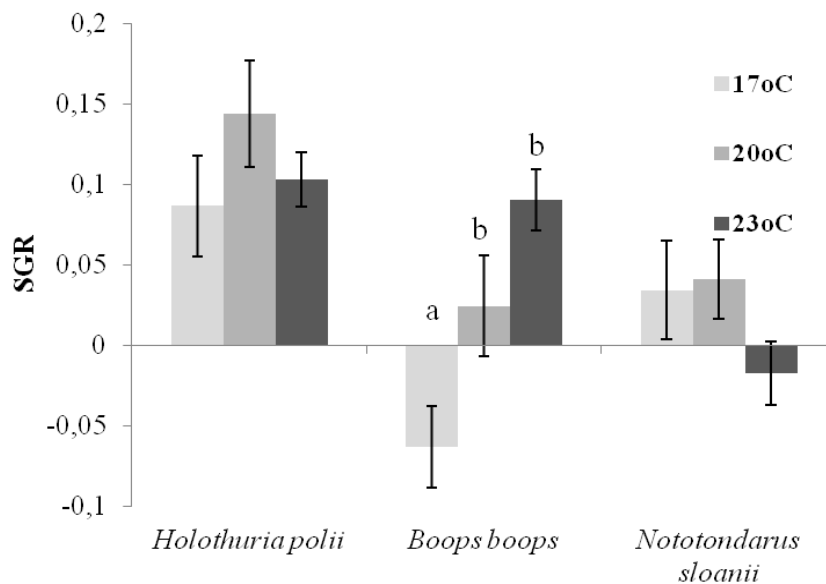
Εικ. 17: Ρυθμός κατανάλωσης τροφής (DFR) των τριτώνων *C. seguenzae* σε τρεις θερμοκρασίες (17, 20 και 23 °C) έναντι τριών τροφών (*H. polii*, *B. boops*, *N. sloanii*). Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί γραμματικοί δείκτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις θερμοκρασίες ($p < 0.05$) για την ίδια τροφή.

2.3.3.2 Αύξηση

Η θερμοκρασία δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά την μεταβολή του βάρους των τριτώνων όταν αυτοί τρέφονταν με ολοθούρια (ANOVA, $p=0.293$) και καλαμάρι (ANOVA, $p=0.169$). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των θερμοκρασιών στο ψάρι ήταν στατιστικά σημαντικές (ANOVA, $p < 0,001$) με τους τρίτωνες να χάνουν βάρος στους 17°C και να αυξάνουν το βάρος τους ανάλογα με την θερμοκρασία (Εικ. 18). Αντίστοιχο πρότυπο ακολουθεί και ο ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR) που ενώ δεν εμφάνισε διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών όταν οι τρίτωνες κατανάλωναν ολοθούρια (ANOVA, $p=0.347$) και καλαμάρι (ANOVA, $p=0.231$), οι διαφορές μεταξύ των 17°C και των άλλων δύο θερμοκρασιών διέφεραν στατιστικά σημαντικά (ANOVA, $p < 0,001$) (Εικ. 19). Ο SGR για τα ολοθούρια κυμάνθηκε από 0.09 ± 0.03 (17°C) έως 0.14 ± 0.02 (20°C), για το ψάρι από -0.06 ± 0.03 (17°C) έως 0.09 ± 0.05 (23°C) και για το καλαμάρι από $-0.02 \pm 0,02$ (23°C) έως $0.04 \pm 0,02$ (20°C).



Εικ. 18: Μεταβολή του σωματικού βάρους σε διάστημα 45 ημερών των τριτώνων *C. segenzae* που τρέφονταν με τρεις τροφές (*H. polii*, *B. boops*, *N. sloanii*) σε τρεις θερμοκρασίες (17, 20 και 23 °C). Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. Οι διαφορετικοί γραμματικοί δείκτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις θερμοκρασίες ($p < 0.05$) για την ίδια τροφή.



Εικ. 19: Ειδικός ρυθμός αύξησης των τριτώνων *C. segenzae* που τρέφονταν με τρεις τροφές (*H. polii*, *B. boops*, *N. sloanii*) σε τρεις θερμοκρασίες (17, 20 και 23 °C). Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα. Οι διαφορετικοί γραμματικοί δείκτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις θερμοκρασίες ($p < 0.05$) για την ίδια τροφή.

2.3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ημερήσια κατανάλωση τροφής των τριτώνων, *Charonia seguenzae*, κυμάνθηκε μεταξύ 0.32 και 3.67% του βάρους τους, και εξαρτήθηκε από το είδος τροφής και την θερμοκρασία. Οι τιμές που παρατηρήθηκαν ήταν ελαφρώς μικρότερες από αυτές που καταγράφηκαν από τους Doxa *et al.* (2012) πιθανώς λόγω της διαφορετικής μεθοδολογίας, αλλά αρκετά υψηλότερες σε σχέση με αυτές που καταγράφηκαν για τον τρίτονα του Βορειο-Δυτικού Ειρηνικού (ο Morton 2012, πιθανολογεί ότι πρόκειται για το *C. lampas*) όπου άτομα αντίστοιχου μεγέθους κατανάλωσαν 139g από το ολοθούριο *Stichopus japonicus* σε περίοδο 30 ημερών.

Η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση της κατανάλωσης της τροφής από τους τρίτονες. Οι εξώθερμοι οργανισμοί, όταν εκτεθούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, μπορεί να ακολουθήσουν μία από τις τρεις ακόλουθες οδούς για να διατηρήσουν τα επίπεδα ενέργειας που προσλαμβάνουν υψηλότερα από τα προαπαιτούμενα για το βασικό τους μεταβολισμό. Μπορούν είτε να αυξήσουν τα επίπεδα τροφής που καταναλώνουν, είτε να αυξήσουν την πεπτική τους ικανότητα απορροφώντας περισσότερη ενέργεια, είτε με συνδυασμό των δύο (Newel & Branch, 1980). Η αύξηση της κατανάλωσης τροφής στις υψηλότερες θερμοκρασίες αποτελεί πιθανώς μια απόκριση των τριτώνων που στοχεύει στην αύξηση της προσλαμβανόμενης ενέργειας που θα αντισταθμίσει το αυξημένο μεταβολικό κόστος. Θετική συσχέτιση ανάμεσα στη θερμοκρασία και στην κατανάλωση τροφής έχει παρατηρηθεί και σε άλλα γαστερόποδα (Stickle *et al.*, 1985, Britz *et al.*, 1997, Foster & Hodgson, 1998, Garcia-Esquivel *et al.*, 2007).

Η τροφή που καταναλώθηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες και οδήγησε στην μεγαλύτερη αύξηση βάρους σε όλες τις θερμοκρασίες ήταν τα ολοθούρια, που αποτελούν φυσικό θήραμα των τριτώνων (Percharde, 1972, Russo *et al.*, 1990). Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας (2.2) θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα ολοθούρια πιθανώς καλύπτουν σε μεγαλύτερο βαθμό τις διατροφικές απαιτήσεις των τριτώνων, καθώς αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του ημερήσιου γεύματός τους όταν επιλέγουν την τροφή που θα καταναλώσουν και οδηγούν σε μεγαλύτερη αύξηση.

Οι τρίτονες, στις συνθήκες που δεν έχαναν βάρος, εμφάνισαν πολύ χαμηλούς ρυθμούς αύξησης που κυμαίνονταν μεταξύ 0.02 και 0.14, τιμές αρκετά μικρότερες από αυτές που είναι καταγεγραμμένες για άλλα γαστερόποδα (π.χ. 0.9-2.17 *Babylonia*

areolata, Chi *et al.*, 2010, 0.51-3.43 *Concholepas concholepas*, Rabi & Maravi, 1997, 0.31-0.48 *Haliotis discus hannai*, O'Mahomey *et al.*, 2014, 0.49-1.05 *Haliotis midae*, Dlaza *et al.*, 2008). Οι πολύ μικροί ρυθμοί αύξησης μπορεί να σχετίζονται είτε με τη φυσιολογία του είδους αλλά και με το μέγεθός τους. Έχει παρατηρηθεί σε άλλα θαλάσσια γαστερόποδα (Chow *et al.*, 1987), κοπήποδα (Vidal, 1980, Hirst & Sheader, 1997) και ψάρια (Bjornson *et al.*, 2007, Amarson *et al.*, Sun & Chen, 2014) ότι το σωματικό μέγεθος επιδρά στον ρυθμό αύξησης με τον δεύτερο να μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους. Ο ρυθμός αύξησης στο μπακαλιάρο *Gadus morhua* και στο πλατύψαρο *Scophthalmus maximus* μειώθηκε από 7.41 σε 0.44 και από 7.63 σε 0.4 σε άτομα βάρους από 2 έως 2000g και 1 έως 1000g αντίστοιχα (Bjornson *et al.*, 2007, Amarson *et al.*, 2009). Σε προγενέστερη μελέτη (Purdom, 1977 από Vidal, 1980) αναφέρεται ότι ο ρυθμός αύξησης του *Scophthalmus maximus* στα 3000g είναι 0.15 τιμή αντίστοιχη με αυτή που εμφάνισαν οι τρίτωνες στην παρούσα μελέτη. Ο μειωμένος έως και μηδενικός ρυθμός αύξησης σε ενήλικα γαστερόποδα έχει αποδοθεί και στην επένδυση της ενέργειας στην αναπαραγωγή, με τα μεγαλύτερα άτομα να επενδύουν μεγαλύτερη ποσότητα ενέργειας στην αναπαραγωγή παρά στην αύξηση (Chatzinikolaou & Richardson, 2010).

Η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας που επιδρά στον ρυθμό αύξησης τόσο των θαλάσσιων ασπόνδυλων (Vidal, 1980, Britz *et al.*, 1997, Garcia-Esquivel *et al.*, 2007) όσο και των ψαριών (Bjornson *et al.*, 2007, Amarson *et al.*, 2009). Η συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού αύξησης και της θερμοκρασίας χαρακτηρίζεται ως καμπυλόγραμμη και θα μπορούσε να περιγραφεί από μια πολυωνυμική εξίσωση τρίτου βαθμού (Bjornson *et al.*, 2007, Amarson *et al.*, 2009). Όμως στην παρούσα μελέτη η θερμοκρασία δεν επηρέασε σημαντικά την αύξηση των τριτώνων, εκτός από την περίπτωση που κατανάλωσαν ψάρι, γεγονός που πιθανώς σχετίζεται με το μέγεθός τους. Ο Vidal (1980) αναφέρει ότι οι αλλαγές της θερμοκρασίας δεν επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό άτομα διαφορετικού μεγέθους. Η μείωση της θερμοκρασίας κατέστειλε δραστικά την αύξηση των μικρότερων κοπήποδων αλλά είχε πολύ μικρή επίδραση στην αύξηση των μεγαλύτερων. Αντίστοιχα μικρότερες είναι και η διαφορές στην αύξηση των *Gadus morhua* και *Scophthalmus maximus* στα μεγαλύτερα μεγέθη (Bjornson *et al.*, 2007, Amarson *et al.*, 2009).

Η θερμοκρασία επηρεάζει την κατανάλωση τροφής των τριτώνων με τις ποσότητες που καταναλώνονται να αυξάνουν, μέσα στα θερμικά όρια που μελετήσαμε, ανάλογα με τη θερμοκρασία. Ο ρυθμός αύξησης των ενήλικων τριτώνων

όμως δεν επηρεάζεται παραμένοντας ιδιαίτερα χαμηλός. Περαιτέρω μελέτες σε μικρότερα άτομα και με συνδυασμό τροφών θα μπορούσαν να δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την επίδραση της θερμοκρασίας στη διατροφή των τριτόνων.

3. Ημερονύκτια δραστηριότητα και θήρευση του τρίτωνα *Charonia sequeenzae*.

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συμπεριφορά των ζώων και η συμπεριφορική οικολογία συνδέονται άμεσα με την βιολογία διατήρησης απειλούμενων ειδών. Παραδείγματος χάριν, η γνώση του προτύπου δραστηριότητας ενός είδους μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στον σχεδιασμό στρατηγικών παρακολούθησης και τεχνικών απογραφής του πληθυσμού (Sutherland, 1998, Caro, 2007). Επιπροσθέτως, η γνώση της συμπεριφοράς θήρευσης μας δίνει πληροφορίες για την τροφική θέση των ζώων σε μια κοινότητα και βοηθά στη κατανόηση της οργάνωσης της κοινότητας (Paine, 1980), στοιχεία απαραίτητα για πολλούς πρακτικούς οικολογικούς σκοπούς όπως η διαχείριση της βιοποικιλότητας, η βιομεγέθυνση (biomagnification) και ο βιοχειρισμός (biomanipulation) με απώτερο στόχο την οικολογική αποκατάσταση.

Η συμπεριφορά θήρευσης και η ημερονύκτια δραστηριότητα του *Charonia sequeenzae* δεν έχουν μελετηθεί, ενώ και οι μελέτες που αφορούν σε άλλα είδη τριτώνων είναι λίγες. Η συμπεριφορά θήρευσης έχει περιγραφεί αρχικά από τον Laxton (1971) σε τρίτωνα της Νέας Ζηλανδίας (*C. capax* και *C. rubicunda*) και αργότερα από τον Morton (2012) σε ένα άτομο *C. lampas* από το Sao Miguel (Azores). Παρατηρήσεις σε εργαστηριακές συνθήκες που σχετίζονται με την ημερονύκτια δραστηριότητα των τριτώνων και την θήρευση πραγματοποιήθηκαν από τον Laxton (1971), ενώ οι Russo *et al.* (1990) αναφερόμενοι σε παρατηρήσεις πεδίου και δεδομένα από αλιείς πρότειναν ότι το *C. lampas* εμφανίζει ένα νυχτόβιο πρότυπο συμπεριφοράς που περιλαμβάνει θήρευση σε βραχώδη και αμμώδη υποστρώματα κατά τη διάρκεια της νύχτας και ανάπαυση σε βραχώδη καταφύγια κατά τη διάρκεια της μέρας. Ελλείψει δεδομένων για το *C. sequeenzae*, οι Russo *et al.* (1990) υπέθεσαν ότι παρουσιάζει ομοιότητες ως προς τον τρόπο ζωής με το Μεσογειακό *C. lampas*. Θεώρησαν λοιπόν ότι στη φύση, το *C. sequeenzae* είναι επιλεκτικός θηρευτής που δραστηριοποιείται σε βραχώδεις και αμμώδεις βυθούς κατά τη διάρκεια της νύχτας

(Russo *et al.*, 1990). Στόχος της παρούσας ενότητας είναι η περιγραφή της συμπεριφοράς θήρευσης και η μελέτη της επίδρασής της στην ημερονύκτια δραστηριότητα των τριτώνων.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη της ημερονύκτιας δραστηριότητας των τριτώνων 9 άτομα από τον πειραματικό πληθυσμό (ενότητα 2.1.2.1) τοποθετήθηκαν ανά 3 σε τρεις κυλινδρικές δεξαμενές (500l) με ανοιχτό σύστημα παροχής νερού (90%/h ανανέωση) και αερισμό, όμοιες με αυτές που περιγράφονται στην ενότητα 2.2.2 (Εικ. 8). Κατά τη διάρκεια των δοκιμών το pH, η θερμοκρασία, η αλατότητα και ο κορεσμός του νερού σε οξυγόνο παρέμειναν σταθερά στο 7.66 ± 0.14 , $24.4^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, 35‰, και 90% αντίστοιχα. Εφαρμόστηκε τεχνητή φωτοπερίοδος 12L:12D και κατά τη διάρκεια της φωτόφασης ο φωτισμός προερχόταν από λάμπες φθορίου 60 W με την ένταση του φωτός να ανέρχεται στα 128 LUX. Για να γίνει δυνατή η καταγραφή της συμπεριφοράς των τριτώνων κατά τη διάρκεια της σκοτόφασης μια λευκή λάμπα 1.8W Led (24 Led GU10, 1,8W) παρείχε φως έντασης μικρότερης των 20 lux. Πάνω από κάθε δεξαμενή, εκτός από το φωτιστικό Led, τοποθετήθηκε και βάση για την προσάρτηση βιντεοκάμερας (Samsung, SMX-F34) (Εικ. 8B).

Για να είναι εφικτή η αναγνώριση των τριτώνων σε κάθε δεξαμενή, τοποθετούνταν άτομα διαφορετικού μεγέθους, ένα μεγάλο ($975 \pm 157.03\text{g}$ μέσο βάρος (W) και $24.97 \pm 0.8\text{cm}$ μήκος κελύφους (SL), ένα μεσαίο ($617.8 \pm 77.11\text{g}$ μέσο βάρος (W) και $21.73 \pm 0.91\text{cm}$ μήκος κελύφους (SL) και ένα μικρό ($294.31 \pm 25.57\text{g}$ μέσο βάρος (W) και $17.23 \pm 1.25\text{cm}$ μήκος κελύφους (SL). Πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμές για κάθε ζώο και κάθε δοκιμή είχε διάρκεια 10 ημερών (συνολική διάρκεια πειραματικής διαδικασίας: 30 ημέρες). Την 4^η μέρα κάθε δοκιμής χορηγούνταν τροφή [τρία ζωντανά ολοθούρια (*Holothuria polii*) ανά δεξαμενή] ενώ τις υπόλοιπες μέρες δεν χορηγούνταν καθόλου τροφή.

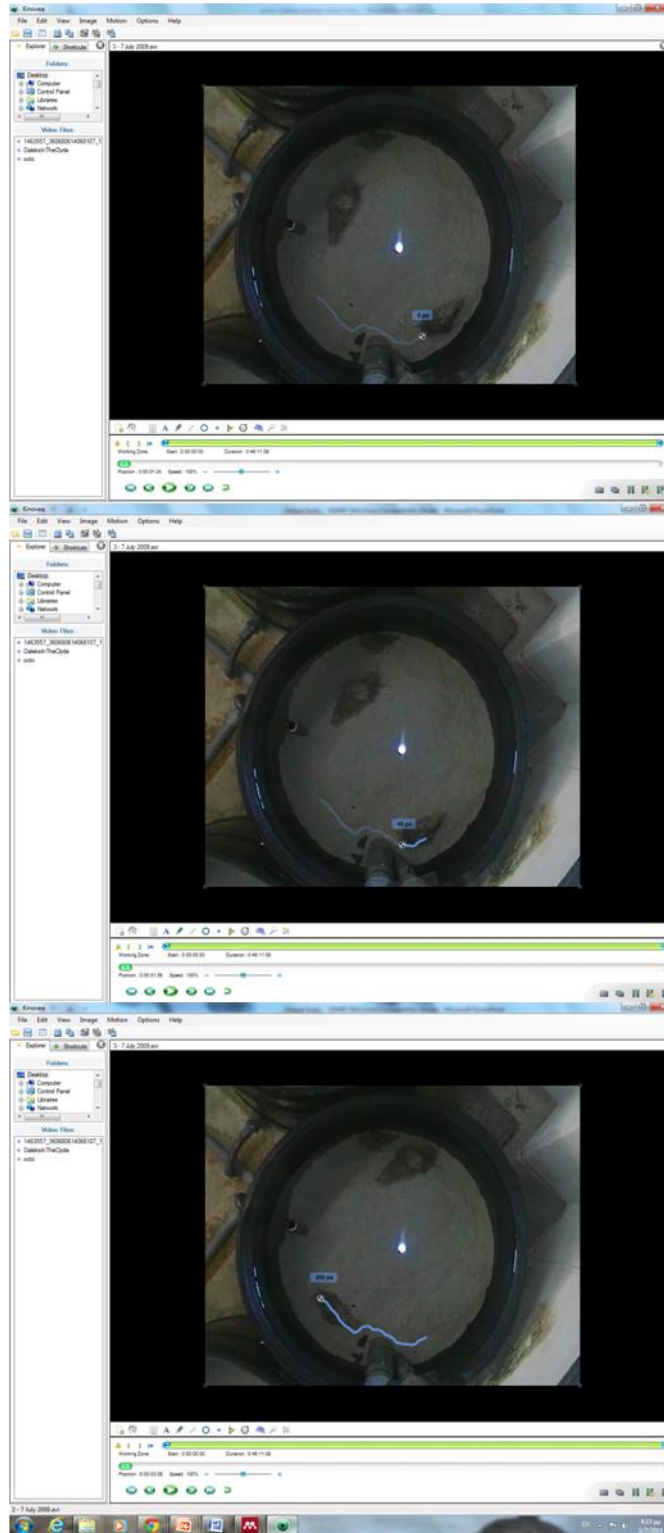
3.2.2 Ανάλυση καταγραφών

Από την ανάλυση των εικόνων που λήφθηκαν από τις μαγνητοσκοπήσεις προέκυψε η διάρκεια κινητικότητας και ακινησίας των τριτώνων σε σχέση με τη φωτοπερίοδο και την τροφική τους κατάσταση (νηστικά, σε χώνεψη κλπ). Καταγράφηκε ο χρόνος αφύπνισης και θήρευσης των τριτώνων έναντι των

ολοθουρίων και πραγματοποιήθηκαν επιπλέον παρατηρήσεις που σχετίζονται με την εκδήλωση ανταγωνισμού για την τροφή μεταξύ των τριτώνων. Για την μέτρηση της ταχύτητας μετακίνησης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Kinovea 0.8.15 που έχει τη δυνατότητα να εντοπίζει και να ακολουθεί κινούμενο σημείο που του υποδεικνύει ο παρατηρητής, στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η άκρη του σίφωνα, και να μετράει, μέσω αυτού, την απόσταση που διανύει το ζώο (Εικ. 20). Γνωρίζοντας την απόσταση που διανύθηκε στη μονάδα του χρόνου υπολογίστηκε η μέση ταχύτητα του κάθε ατόμου κατά τη διάρκεια της ημέρας, της νύχτας και πριν, μετά και κατά τη διάρκεια της θήρευσης.

3.2.3 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν για κανονικότητα (Kolmogorov–Smirnov test) και ισότητα των διασπορών (Bartlett’s test of sphericity). Εφόσον πληρούνταν οι προϋποθέσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς (1,2 or 3-way ANOVA), η οποία δίνει στοιχεία για το αν οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών διαφορετικών ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές ή όχι. Όταν δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις για την ανάλυση διασποράς, πραγματοποιούταν ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis. Όταν οι μέσες τιμές διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) χρησιμοποιούταν το Tukey’s test (HSD test) για την ανάλυση των διαφορών.



Εικ. 20: Χρήση λογισμικού Κίνοβια για την μέτρηση αποστάσεων και τον υπολογισμό της ταχύτητας των τριτώνων. Ο παρατηρητής έχει επιλέξει ως σημείο εντοπισμού την άκρη του σιφώνα του τρίωνα.

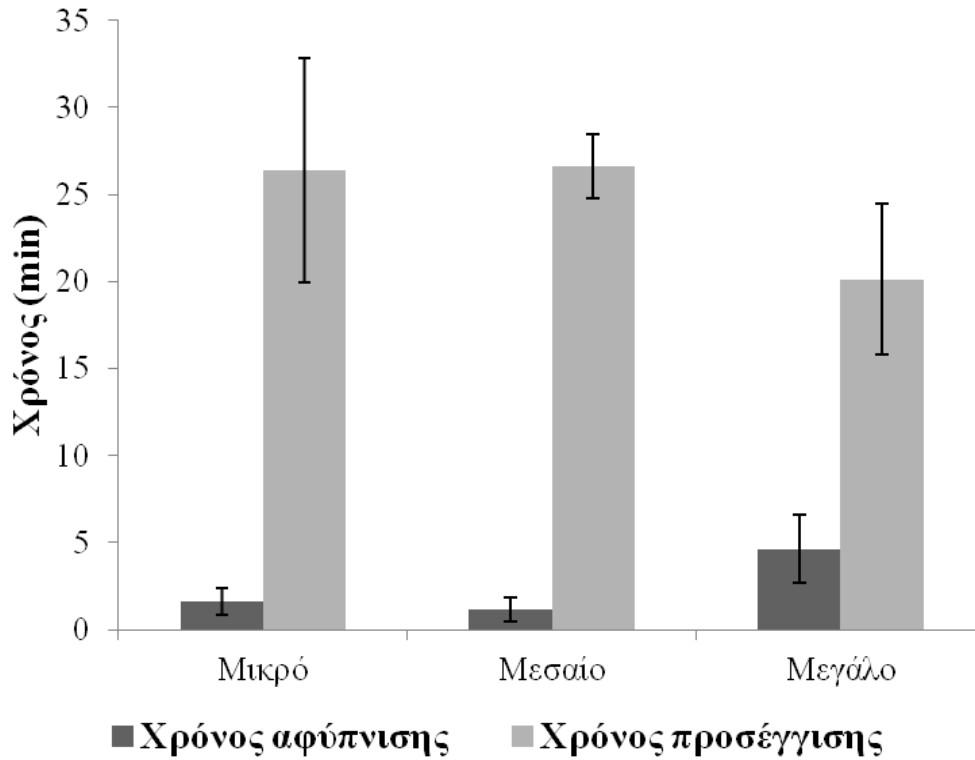
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1 Θήρευση

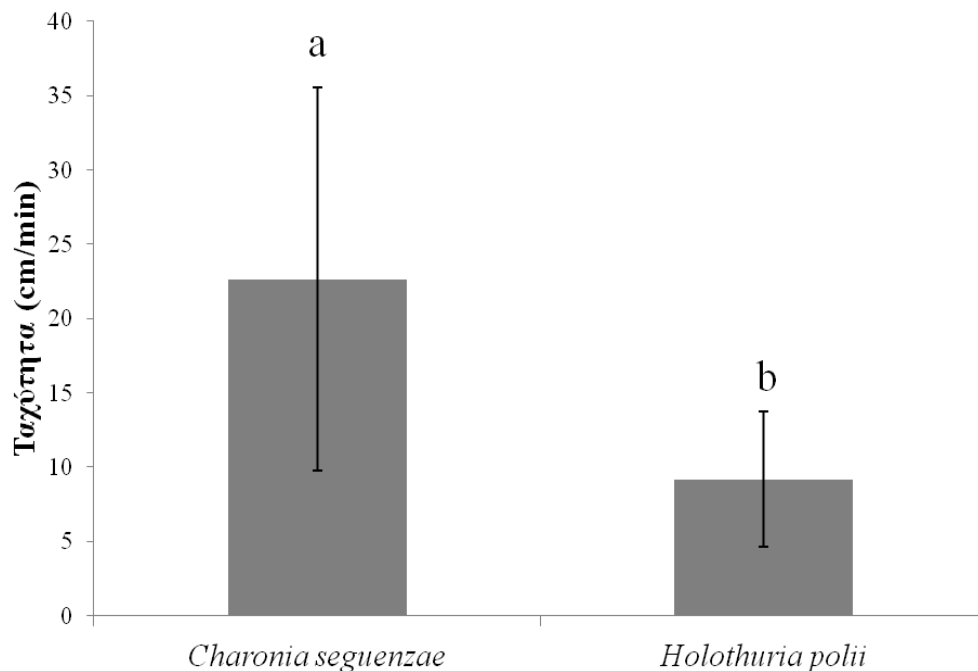
Η συμπεριφορά θήρευσης των τριτώνων δεν διαφοροποιείται σημαντικά από την συμπεριφορά κατανάλωσης τροφής που περιγράφεται στην ενότητα 2.1.3.2 (Εικ. 3). Η διαφορά έγκειται στην κίνηση του θηράματος και στην καταδίωξή του από τους τρίτωνες, αλλά η διαδοχή των κινήσεων που περιγράφονται στην Εικ. 3 είναι αντίστοιχη με αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα ενότητα. Παρατηρήθηκε επίσης ένα επαναλαμβανόμενο πρότυπο που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ανταγωνισμός για την τροφή ή και ως ομαδική θήρευση. Στα 2/3 των δοκιμών ένας από τους τρεις τρίτωνες της κάθε δεξαμενής κινήθηκε προς την τροφή που είχε εναγκαλίσει και κατανάλωνε ένας άλλος τρίτωνας (Εικ. 21). Σε όλες τις περιπτώσεις, το άτομο την τροφή του οποίου διεκδικούσαν οι άλλοι τρίτωνες ήταν αυτό που προσέγγιζε και άρχιζε πρώτο να καταναλώνει την τροφή. Ο μέσος χρόνος αφύπνισης και προσέγγισης του θηράματος ήταν 2.47 ± 1.33 και 21.29 ± 4.83 λεπτά αντίστοιχα και δεν επηρεάστηκε από το μέγεθος των ατόμων (Kruskal-walis, $p=0.282$ και $p=0.179$ αντίστοιχα)(Εικ. 22). Η μέση ταχύτητα των τριτώνων κατά τη διάρκεια της θήρευσης υπολογίστηκε στα 22.84 ± 12.88 cm/min και διέφερε στατιστικά σημαντικά από αυτή των ολοθουρίων (Kruskal-Walis, $p=0.017$) που ανέρχονταν στα 9.17 ± 4.55 cm/min (Εικ. 23).



Εικ. 21: Εκδήλωση ανταγωνισμού για το θήραμα μεταξύ δύο τριτώνων *Charonia seguenzae*. Το άτομο που βρίσκεται κάτω δεξιά ήταν το πρώτο που προσέγγισε την τροφή και έχει εναγκαλίσει το θήραμα ενώ το άτομο που βρίσκεται πάνω αριστερά ήρθε αργότερα και διεκδικεί το ίδιο θήραμα. (από Κουρεπίνη, 2009)



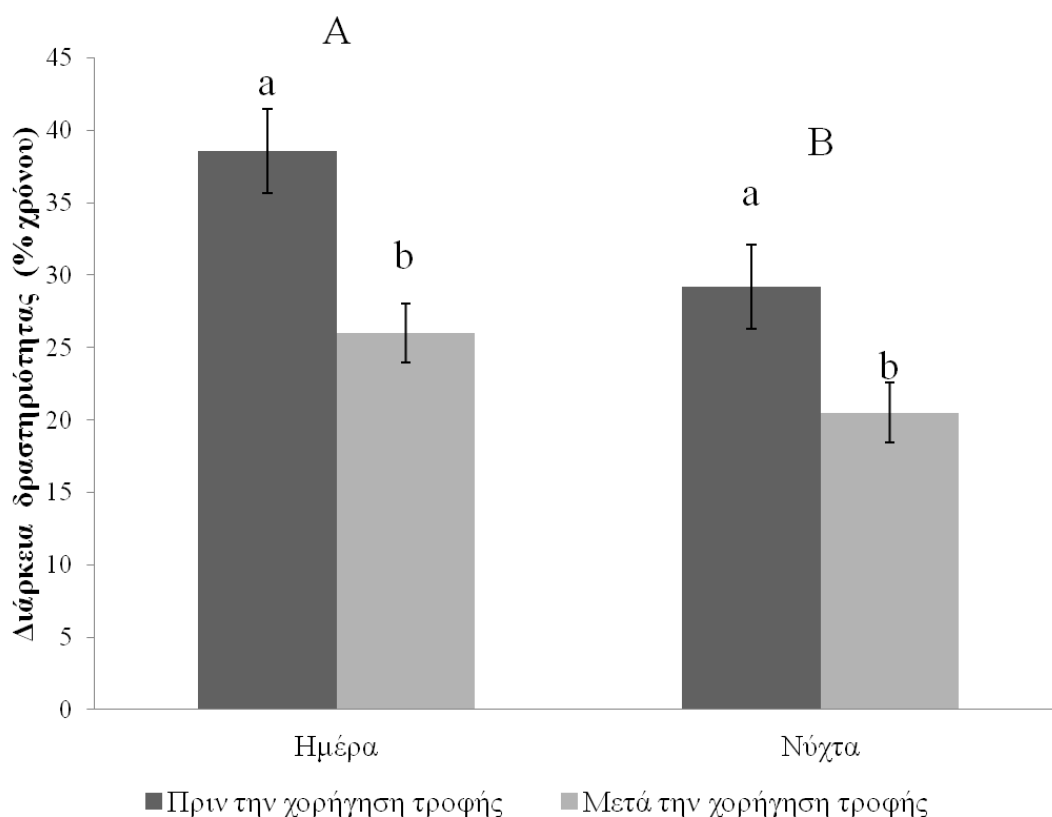
Εικ. 22: Χρόνος αφύπνισης και προσέγγισης (min) του θηράματος από το *Charonia seguenzae* ανά κλάση μεγέθους (μικρό, μεσαίο, μεγάλο). Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα.



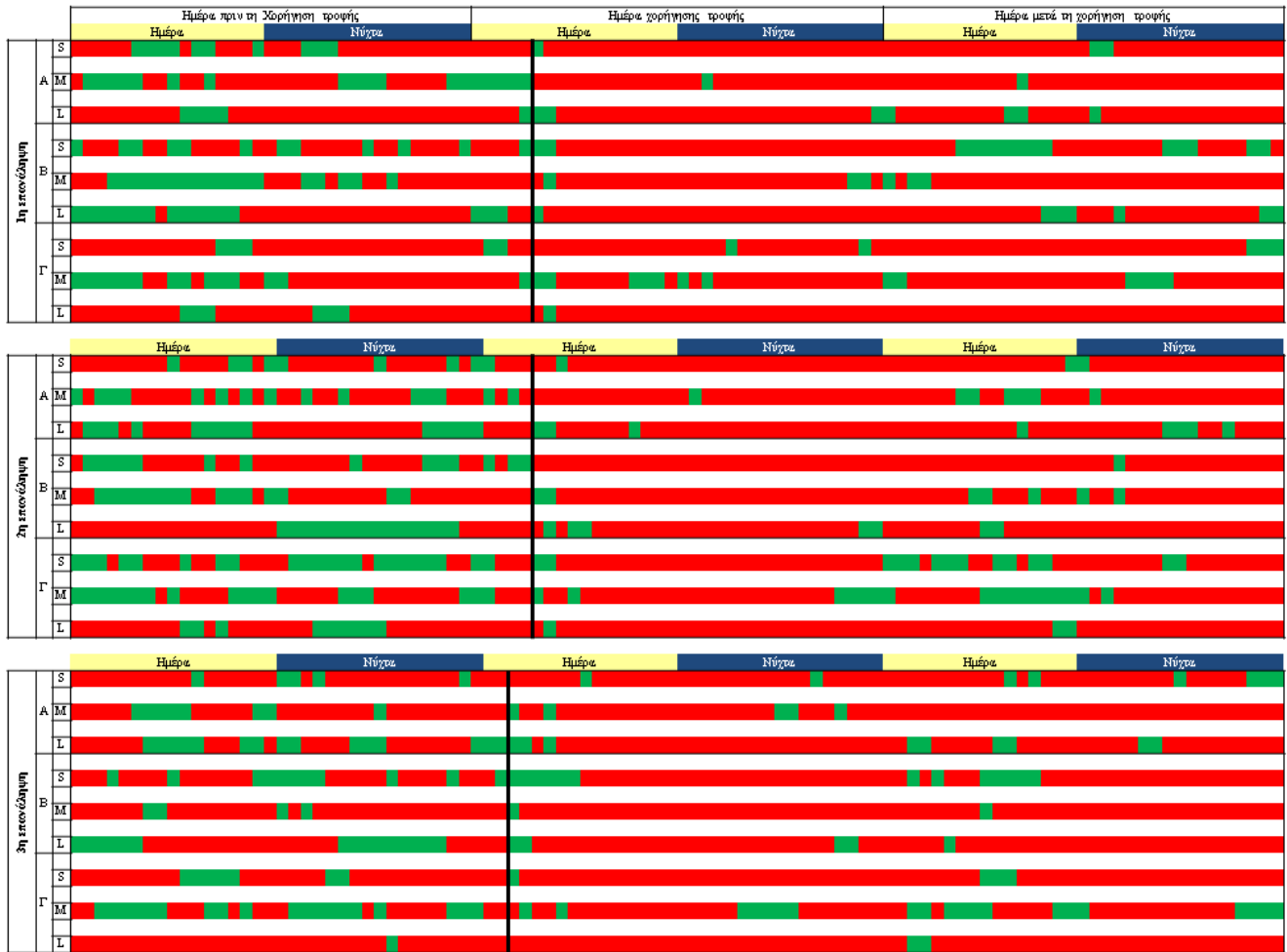
Εικ. 23: Ταχύτητα (cm/min) του θηρευτή (*C. seguenzae*) και του θηράματος (*H. polii*) κατά τη διάρκεια της θήρευσης. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).

3.3.2 Ημερονύχτια δραστηριότητα

Οι τρίτωνες εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της ημέρας πριν από την χορήγηση τροφής ($38.6 \pm 2.9\%$), ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας μετά την χορήγηση τροφής ($20.5 \pm 2.1\%$). Η διπαραγοντική ανάλυση διασπορών έδειξε ότι η δραστηριότητα μεταξύ ημέρας και νύχτας ($p=0.003$) αλλά και πριν και μετά την χορήγηση τροφής ($p<0.001$) διαφέρει στατιστικά σημαντικά (Εικ. 24). Παρατηρήθηκε ότι την ημέρα πριν την χορήγηση τροφής οι τρίτωνες ήταν ιδιαίτερα δραστήριοι ενώ αμέσως μετά τη χορήγηση τροφής παρέμειναν αδρανείς για μεγάλο χρονικό διάστημα (Εικ. 25).

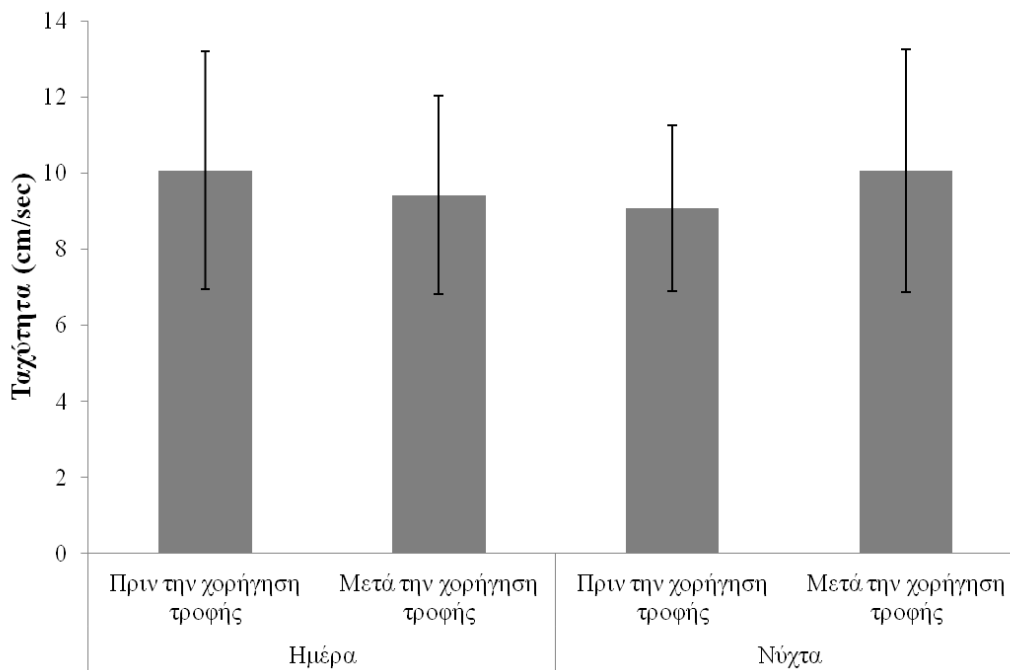


Εικ. 24: Διάρκεια δραστηριότητας (% του χρόνου) των τριτώνων τη ημέρα και τη νύχτα, πριν και μετά τη χορήγηση τροφής. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί μικροί γραμματικοί δείκτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές πριν και μετά τη χορήγηση τροφής ($p<0.001$) για την ίδια συνθήκη φωτοπεριόδου, ενώ οι διαφορετικοί κεφαλαίοι γραμματικοί δείκτες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ημέρας και της νύχτας ($p=0.003$) για την ίδια συνθήκη χορήγησης τροφής.

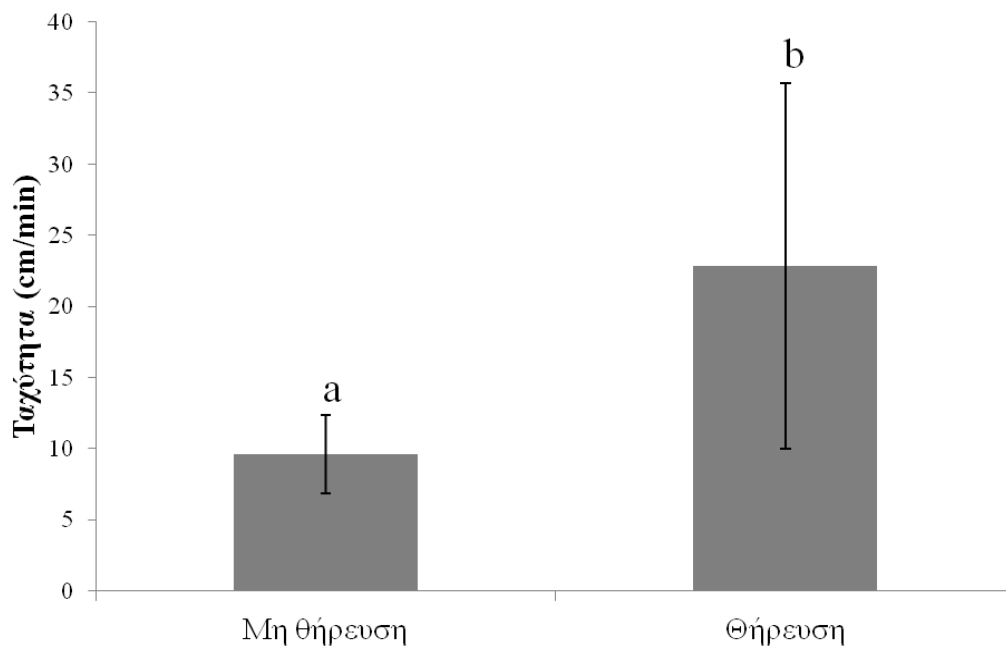


Εικ. 25: Απεικόνιση της ημερονύχτιας δραστηριότητας των τριτώνων (S: μικρός, M: μεσαίος, L: Μεγάλος) στις τρεις δεξαμενές (A,B,Γ) και στις τρεις επαναλήψεις για το χρονικό διάστημα από μία μέρα πριν μέχρι μία μέρα μετά την χορήγηση τροφής. Η περίοδος που οι τρίτωνες παραμένουν αδρανείς φαίνεται με κόκκινο χρώμα ενώ η περίοδος που βρίσκονται εν κινήσει με πράσινο. Το κίτρινο χρώμα αντιστοιχεί στην ημέρα και το μπλε στη νύχτα, ενώ η μαύρη γραμμή υποδηλώνει τη χρονική στιγμή χορήγησης της τροφής.

Η ταχύτητα με την οποία κινούνταν οι τρίτωνες κυμάνθηκε από 9.07 ± 2.79 cm/min (νύχτα, πριν την χορήγηση τροφής) έως 10.07 ± 3.13 cm/min (ημέρα, πριν την χορήγηση τροφής). Η ταχύτητα των τριτώνων δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ ημέρας και νύχτας ($p=0.418$), πριν και μετά τη χορήγηση τροφής ($p=0.505$) αλλά και μεταξύ των διαφορετικών μεγεθών των τριτώνων (3-way ANOVA, $p=0.287$) (Εικ. 26). Οι υψηλότερες ταχύτητες παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της θήρευσης και ανέρχονταν σε 22.84 ± 12.88 cm/min, διέφεραν σημαντικά από τις τιμές απουσία θηράματος, 9.61 ± 2.76 cm/min (t-test, $p<0.001$) (Εικ. 27).



Εικ. 26: Ταχύτητα (cm/min) με την οποία κινούνται οι τρίτωνες σε σχέση με την χορήγηση τροφής (πριν και μετά) και την φωτοπερίοδο. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση.



Εικ. 27: Ταχύτητα (cm/min) με την οποία κινούνται οι τρίτωνες απουσία και παρουσία θηράματος. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$).

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο τρίτωνες του είδους *Charonia seguenzae*, όπως τα άλλα μέλη του ίδιου γένους (Laxton, 1971, Kang & Kim, 2004, Morton, 2012) εμφάνισαν ενεργό πρότυπο θήρευσης, κυνηγώντας, αιχμαλωτίζοντας και καταναλώνοντας κινούμενα θηράματα. Τα είδη της υπεροικογένειας των Tonnoidea είναι σαρκοβόρα και κατατάσσονται σε τρεις ομάδες ανάλογα με τις διατροφικές τους συνήθειες (Laxton, 1971). Είναι είτε θηρευτές, είτε νεκροφάγα, είτε «βοσκητές» (καταναλώνουν εδραία ζώα). Το γένος *Charonia* είναι το μόνο της υποοικογένειας των Cymatiinae (πρώην Cymatidae) που εμφανίζει ενεργή θήρευση, καθώς άλλα είδη της ίδιας υποοικογένειας, όπως τα *Cabestana spengleri*, *Monoplex australasiae* και *Mayena australasia* τρέφονται με δίθυρα και ασκίδια. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ενώ οι τρίτωνες δύνανται να καταναλώσουν αποκελυφωμένα μύδια σε συνθήκες αιχμαλωσίας (Doxa *et al.*, 2012) οι Kang & Kim (2014) αναφέρουν ότι δεν καταναλώνουν ζωντανά δίθυρα. Καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία της ενεργής θήρευσης παίζει η ταχύτητα που αναπτύσσουν οι τρίτωνες όταν καταδιώκουν το θήραμά τους, η οποία στην παρούσα μελέτη ήταν υπερδιπλάσια από αυτή των ολοθουρίων. Η συμπεριφορά θήρευσης του *C. seguenzae* εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με τα πρότυπα που έχουν περιγραφεί σε άλλα είδη του ίδιου γένους (Laxton, 1971, Morton, 2012), οι οποίες συζητούνται στην ενότητα 2.1.4. Το πρότυπο θήρευσης ζωντανών θηραμάτων διέφερε από το πρότυπο κατανάλωσης τροφής που περιγράφηκε στην ενότητα 2.1 όταν χορηγήθηκαν νεκρά άτομα μόνο ως προς τους χρόνους αφύπνισης και προσέγγισης. Όταν στους τρίτωνες χορηγήθηκαν ζωντανά θηράματα οι χρόνοι αφύπνισης και προσέγγισης της τροφής μειώθηκαν σημαντικά σε σχέση με τους χρόνους που καταγράφηκαν όταν χορηγήθηκαν νεκρά άτομα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή της σύνθεσης των αμινοξέων που παρατηρείται κατά την συντήρηση των ατόμων στην κατάψυξη, η οποία μπορεί να επηρεάσει την γεύση και την οσμή της τροφής (Ciampa *et al.*, 2012).

Η εκδήλωση συμπεριφοράς θήρευσης από το *C. seguenzae* δεν επηρεάζεται αρνητικά από το φως, καθώς τα ζώα κυνηγούν και τρέφονται κατά τη διάρκεια της ημέρας (παρούσα μελέτη, Doxa *et al.*, 2012, 2013). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν γίνει στη φύση για το συγγενικό *C. variegata* που αν και θεωρείται νυχτόβιο παρατηρήθηκε σε αρκετές περιπτώσεις να θηρεύει κατά τη διάρκεια της μέρας (Percharde, 1972). Αντιθέτως, τα συγγενικά είδη *C. capax* και *C. rubicunda*

εμφανίζουν αποκλειστικά νυχτερινή θήρευση (Laxton, 1971). Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες αιχμαλωσίας, η χορήγηση θηράματος δεν οδήγησε σε εκδήλωση συμπεριφοράς θήρευσης και κατανάλωση του θηράματος κατά τη διάρκεια της ημέρας αλλά μόνο κατά τη διάρκεια της νύχτας. Παρόμοιο είναι το πρότυπο που προτείνεται και για το Μεσογειακό *C. lampas* (Russo *et al.*, 1990) που φέρεται να παραμένει κρυμμένο σε βραχώδες υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της ημέρας και να δραστηριοποιείται για να τραφεί κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Ένα ακόμα στοιχείο του προτύπου θήρευσης των τριτώνων που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι η εκδήλωση πιθανώς ανταγωνισμού για την τροφή. Ανταγωνισμός για τροφή έχει παρατηρηθεί και σε άλλα σαρκοφάγα γαστερόποδα όπως τα *Stramonita (=Thais) haemastoma* (Brown & Alexander, 1994) και *Neverita delessertiana* (Hutchings & Herbert, 2013) και στο φυσικό περιβάλλον αλλά και σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Κοινό χαρακτηριστικό και των τριών μελετών ήταν η ύπαρξη ανταγωνισμού παρά την παρουσία περισσειας τροφής. Οι Brown & Alexander (1994) ερμηνεύουν τον ανταγωνισμό για τροφή ως ομαδική θήρευση, που αποβλέπει στον καλύτερο εντοπισμό της τροφής. Οι τραυματισμένοι ιστοί του θηράματος απελευθερώνουν περισσότερες χημικές ουσίες τις οποίες αντιλαμβάνονται και ακολουθούν οι υπόλοιποι θηρευτές. Το ίδιο πρότυπο φαίνεται να ακολουθούν και οι τρίτωνες καθώς κάθε φορά που παρατηρήθηκε ανταγωνισμός, επρόκειτο για την τροφή του τρίτου που αιχμαλώτισε και ξεκίνησε να καταναλώνει πρώτος την τροφή του. Η ομαδική θήρευση στο *Stramonita (=Thais) haemastoma* έχει συσχετιστεί με το μέγεθος του θηράματος, καθώς ένας πιθανός λόγος για την εκδήλωση ανταγωνισμού ή ομαδικής θήρευσης είναι η κατανάλωση μεγάλων θηραμάτων (Brown & Alexander, 1994). Αν και το μέγεθος των ολοθουρίων δεν στηρίζει την παρούσα θεωρία, καθώς μπορούν να καταναλωθούν ολόκληρα από τους τρίτωνες, το μέγεθος και η δυνατότητα ακρωτηριασμού των αστεριών (Morton, 2012), που αποτελούν το κύριο θήραμα των τριτώνων, θα μπορούσε να δικαιολογήσει την ανάγκη για ομαδική θήρευση που θα βελτιστοποιούσε την ικανότητα σύλληψης και κατανάλωσης ολόκληρων των αστεριών. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από τον Percharde (1972) ο οποίος παρατήρησε τρίτωνες του είδους *C. variegata* να κυνηγούν σε ζευγάρια δεκάδες αστερίες του είδους *Echinaster sentus* στο Τρινταντ.

Η δραστηριότητα των τριτώνων επηρεάστηκε από την φωτοπερίοδο εμφανίζοντας εντονότερη δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της μέρας. Το φως αποτελεί έναν σημαντικό εξωγενή παράγοντα που επηρεάζει τα πρότυπα

δραστηριότητας σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων μυκήτων, φυτών και ζώων. Η προβλεψιμότητα των κύκλων της φωτοπεριόδου επιτρέπει σε πολλά ζώα να συγχρονίζουν τη δραστηριότητα με αυτή άλλων οργανισμών στο περιβάλλον τους, όπως τα θηράματα και οι θηρευτές τους (Newcomb *et al.*, 2004). Εκτός από κάποιες αναφορές για κατανάλωση τριτώνων από τον αετό *Aetobatus narinari* και τη χελώνα *Caretta caretta* δεν υπάρχουν αναφορές για άλλους θηρευτές των τριτώνων (Percharde, 1972). Τα είδη που αποτελούν συνήθως τα θηράματα των τριτώνων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στα πρότυπα δραστηριότητάς τους. Έτσι παραδείγματος χάριν, το *Echinaster brasilensis* (Peres *et al.*, 2014) χαρακτηρίζεται ως νυκτόβιο, ενώ τα *Luidia sarsi* (Fenchel, 1965) και *Holothuria whitmaei* (Shiel & Knott, 2008) ως ημερόβια, το *Astropecten articulatus* εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα την αυγή και το σούρουπο (Beddingfield & McClintock, 1993) ενώ τα μικρά άτομα του κοραλλιοφάγου αστερία *Acanthaster planci* δραστηριοποιούνται τη νύχτα, σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα που δραστηριοποιούνται τη μέρα (De'ath & Moran, 1998).

Η θήρευση, και ειδικότερα η πλήρωση του στομάχου των τριτώνων επηρέασε την ημερονύχτια δραστηριότητα του *C. seguenzae*. Αν και η ταχύτητα κίνησης των τριτώνων δεν διέφερε πριν και μετά τη θήρευση, υπερδιπλασιάστηκε κατά την διάρκεια της θήρευσης, καθιστώντας τους τρίτωνες δεινούς θηρευτές. Οι τρίτωνες ήταν πιο δραστήριοι πριν από τη θήρευση όταν είχαν χωνέψει το προηγούμενο θήραμά τους, διαδικασία που χρειάζεται 6 με 8 ημέρες για να ολοκληρωθεί (Doxa *et al.*, 2013). Κατά τη διάρκεια της χώνεψης καταγράφηκαν μεγάλα χρονικά διαστήματα, που ξεπερνούσαν τις 48 ώρες, στα οποία τα ζώα παρέμειναν ακίνητα. Η συμπεριφορά των νηστικών θηρευτών συχνά διαφέρει από αυτή των κορεσμένων. Οι νηστικοί θηρευτές μπορεί να είναι λιγότερο επιλεκτικοί (Pastorok 1980, Bence & Murdoch 1986), να εμφανίζουν υψηλότερο ρυθμό επιθέσεων (Ware 1972, Fox & Murdoch 1978, Hughes & Elner 1979, Bence & Murdoch 1986), να ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα που βρίσκονται σε μεγαλύτερες αποστάσεις (Holling 1966), και να τρέφονται με υψηλότερο ρυθμό (Bayne & Scullard 1978, Pastorok 1980, Bence & Murdoch 1986), αποκρίσεις που συνεπάγονται μεγαλύτερη δραστηριότητα.

Η γνώση του προτύπου θήρευσης και η αλληλεπίδρασή του με την ημερονύχτια συμπεριφορά του *C. seguenzae* θα βοηθήσει στον σχεδιασμό στρατηγικών παρακολούθησης και τεχνικών απογραφής του πληθυσμού, ειδικά σε περιοχές όπου τα φυσικά αποθέματα είναι πολύ περιορισμένα, όπως ο μεγάλος

κοραλλιογενής ύφαλος (Endean, 1977). Περαιτέρω μελέτης χρήζει η εκδήλωση ανταγωνισμού για την τροφή που παρατηρήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, καθώς και η αποτελεσματικότητα των τριτώνων στην θήρευση αστεριών, ειδικότερα το κοραλλιοφάγου αστερία *Acanthaster planci*, μεμονωμένα, ή σε ομάδες.

4. Πρότυπο αναπαραγωγής του τρίωνα *Charonia sequeenzae* σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα προσοβράγχια γαστερόποδα είναι συνήθως γονοχωριστικά είδη, αν και σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ασύγχρονος ερμαφροδιτισμός (αναστροφή φύλου) σε είδη όπως τα *Crepidula fornicata* (Collin, 1995) και *Busycon carica* (Castagna & Kraeuter 1994). Όλα τα μέλη της οικογένειας Ranellidae είναι γονοχωριστικά, μεταφέρουν το σπέρμα μέσω σύζευξης και η γονιμοποίηση είναι εσωτερική (Killburn & Rippey, 1982, Webber, 1977). Σε όλα τα προσοβράγχια η γονάδα είναι μονή και βρίσκεται στη σπλαχνική μάζα ανακατεμένη με τον μεσεντέριο αδένα (Hyman, 1967). Ανατομικά, το αναπαραγωγικό σύστημα των Ranellidae, ειδικότερα το θηλυκό, είναι αρκετά εξελιγμένο και ομοιάζει με αυτό των νεογαστεροπόδων (Laxton, 1969). Το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα των τριτώνων (γένος *Charonia*), όπως παρουσιάζεται από τη Hyman (1967), αποτελείται από τον όρχη και το σπερματογωγό, ο οποίος λίγο μετά τον όρχη μεγεθύνεται και σχηματίζει πολυάριθμες συνελίξεις που χρησιμεύουν ως σπερματοθήκες για την αποθήκευση σπέρματος. Ο σπερματογωγός διαφοροποιείται, και στο τελικό του τμήμα, που βρίσκεται στη βάση του πέους, σχηματίζεται ο προστάτης αδένας. Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από την ωοθήκη, και την σάλπιγγα ή ωαγωγό. Το τελικό σημείο του ωαγωγού μεγεθύνεται και σχηματίζει ένα πολύ διευρυμένο σωλήνα που καταλήγει κοντά στην έδρα, στο θηλυκό γονοπόρο. Αυτός ο διευρυμένος σωλήνας ονομαζόταν μήτρα (uterus) αλλά έχει επικρατήσει ο όρος «pallial oviduct». Στο τελικό άκρο του ο «pallial oviduct» συνδέεται με ένα μικρό σάκο, τη σπερματοθήκη που χρησιμεύει για την αποθήκευση του σπέρματος μετά τη σύζευξη. Το εγγύς τμήμα του pallial oviduct» καταλαμβάνεται από τον αδένα αλβουμίνης ο οποίος εκκρίνει την λευκωματώδη ουσία που περιβάλλει τα αυγά. Το άπω και μεγαλύτερο τμήμα του «pallial oviduct» καταλαμβάνεται από τον αδένα

κάψουλας (capsule gland) στον οποίο σχηματίζονται οι κάψουλες μέσα στις οποίες τοποθετούνται τα αυγά.

Τα περισσότερα μεσογαστερόποδα συμπεριλαμβανομένων όλων των Ranellidae τοποθετούν τα αυγά τους σε κάψουλες οι οποίες τους παρέχουν προστασία από μηχανικό και οσμωτικό στρες, από υπεριώδη ακτινοβολία και από θηρευτές (Pechenik 1978, 1979, 1982, 1983, 1986, Perron 1981, Lord 1986, Hawkins & Hutchinson, 1988, Rawlings, 1996) Όσον αφορά στην συνοχή τους, οι κάψουλες ποικίλουν από μαλακές-ζελατινώδεις έως σκληρές (Hyman, 1967) ενώ και το σχήμα τους ποικίλει και μπορεί να είναι σφαιρικό, οβάλ, κωνοειδές, ροπαλόμορφο κ.α. Τα θηλυκά άτομα εναποθέτουν τις κάψουλες σε ομάδες ή συστάδες που προσκολλούν στο υπόστρωμα μέσω μιας διευρυμένης βάσης.

Η γονική φροντίδα περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα συμπεριφορικών, μορφολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών, τα οποία έχουν εξελιχθεί στα περισσότερα φύλα προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες επιβίωσης των απογόνων. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη της γονικής φροντίδας στα σπονδυλωτά, και πολλά τάξα ασπονδύλων παραμένουν μη ή υπομελετημένα σε σχέση με την οικολογία και την εξέλιξη της γονικής φροντίδας (Clutton-Brock, 1991). Στα γαστερόποδα, η γονική φροντίδα περιλαμβάνει την προσθήκη μέσα στις εμβρυικές κάψουλες μη γονιμοποιημένων αυγών (nurse eggs) που χρησιμεύουν ως τροφή για τα αναπτυσσόμενα έμβρυα, την επώαση των εμβρυικών σάκων κάτω από τον πόδα, την μεταφορά των εμβρυικών σάκων προσκολλημένων στο κέλυφός τους, την προετοιμασία των χώρων στους οποίους θα εναποθέσουν τους εμβρυικούς σάκους, την κράτηση των αυγών στη μανδρακλή κοιλότητα, ακόμα και την ωζωτοκία και την ζωτοκία (Purchon, 1977, Baur, 1984, Tompa *et al.*, 1984, Kamel & Grosberg, 2012).

Η αναπαραγωγή πολλών θαλάσσιων γαστερόποδων έχει μελετηθεί εκτενώς για περισσότερο από έναν αιώνα (π.χ. Linke, 1933, Anderson, 1959, Amio, 1963, Cather, 1963, D'Asaro, 1969, Laxton, 1969, Conklin, 1897, Zhou *et al.*, 2000, Tang *et al.*, 2012) και κάποια είδη όπως αυτά του γένους *Haliotis* (Britz *et al.*, 1997, Zhu *et al.*, 2002, Garcia-Esquivel *et al.*, 2007, Hannon *et al.*, 2012, O'Mahoney *et al.*, 2014) και του γένους *Babylonia* έχουν εισαχθεί στις υδατοκαλλιέργειες (Chaitanawisuti *et al.*, 2010). Οι αναφορές στην αναπαραγωγή των μελών της οικογένειας Ranellidae αφορούν τα είδη *Cabestana spengleri*, *Monoplex australasiae*, *Mayena astralasia* (Laxton, 1969), *Argobuccinum pustulosum* (Gallardo *et al.*, 2012), *Fusitriton*

magellanicus (Canete *et al.*, 2012) και μέλη του γένους *Charonia*. Η πρώτη αναφορά για μέλη του γένους *Charonia* έγινε το 1969 από τον Laxton που παρατήρησε την σύζευξη και την εναπόθεση εμβρυικών σάκων στο *Charonia rubicunda* σε συνθήκες αιχμαλωσίας ενώ λίγο αργότερα, ο Berg (1971) έκανε αντίστοιχες παρατηρήσεις για το *Charonia tritonis* και ο Percharde (1972) παρατήρησε την σύζευξη στο *Charonia variegata*. Μεσολάβησε ένα διάστημα 30 και 40 χρόνων αντίστοιχα μέχρι τις επόμενες αναφορές στην αναπαραγωγή του *Charonia tritonis* από τους Nugranad *et al.* (2000) και Zhang *et al.* (2013), ενώ δεν υπάρχουν αναφορές για το *Charonia seguenzae* ή το μέχρι πρότεινος θεωρούμενο ίδιο είδος *Charonia variegata* εκτός από την παρατήρηση της σύζευξης 2 ατόμων στο φυσικό περιβάλλον από τον Percharde (1972). Στόχος της παρούσας ενότητας είναι η περιγραφή του προτύπου αναπαραγωγής στους τρίτονες καθώς και η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αναπαραγωγική απόδοση υπό τα ίδια θερμοκρασιακά καθεστάτα (17, 20 και 23°C) που μελετήθηκαν στο κεφάλαιο 2.3.

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Μελέτη αναπαραγωγικής συμπεριφοράς

Για την μελέτη της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς παρακολουθούνταν ο πειραματικός πληθυσμός (ενότητα 2.1.2.1) που διατηρούνταν στις καραντίνες και τη διαδρομή επίσκεψης του Ενυδρείου Κρήτης τα έτη 2007-2011. Πραγματοποιούνταν παρατηρήσεις σε ημερήσια βάση (από τις 8:00 έως τις 15:00) και καταγράφονταν η σύζευξη των ατόμων (χρονική στιγμή, διάρκεια), η εναπόθεση εμβρυικών σάκων και η συμπεριφορά της μητέρας.

Στις καραντίνες υπήρχαν 150 άτομα που είχαν τοποθετηθεί σε ομάδες των 5-10 ατόμων σε ενυδρεία 150 και 300L με ημίκλειστο σύστημα νερού (ανανέωση 30%/h) και μηχανισμό φιλτραρίσματος του νερού (ανακύκλωση 100%/h). Μόνο δύο πληθυσμοί των 8 ατόμων διατηρήθηκαν στους 17 °C την περίοδο 2010-2011 ενώ τα υπόλοιπα άτομα ισομοιράστηκαν σε ομάδες που τοποθετήθηκαν στους 20 και 23 °C. Η θερμοκρασία ρυθμιζόταν στην επιθυμητή τιμή, χάρη στη δυνατότητα παροχής νερού με θερμοκρασίες 17, 20 και 23 °C. Για το φωτισμό χρησιμοποιούνταν λάμπες φθορίου 60W και η φωτοπερίοδος ρυθμιζόταν (12L:12D). Η αλατότητα ήταν σταθερή στο 35-36‰ και ο κορεσμός του νερού σε οξυγόνο μεγαλύτερος από 90%. Η διατροφή τους περιλάμβανε κυρίως κατεψυγμένους αστερίες, ψάρι (*Boops boops*) και γαρίδες, και ζωντανά ολοθούρια και αχινούς.

Στη διαδρομή επίσκεψης του Ενυδρείου Κρήτης, είχαν τοποθετηθεί το 2010 οχτώ τρίτωνες στο ενυδρείο N23 χωρητικότητας 5620 l με ημίκλειστο σύστημα νερού (ανανέωση 1-2%/h) και μηχανισμό φιλτραρίσματος του νερού (ανακύκλωση 100%/h). Η θερμοκρασία κυμαινόταν μεταξύ $19.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (Φεβρουάριος) και $22.4 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (Αύγουστος). Για το φωτισμό χρησιμοποιούνταν λάμπες φθορίου 60W και η φωτοπερίοδος ρυθμιζόταν τεχνητά μεταξύ 10L:14D το χειμώνα (1 Οκτωβρίου – 30 Απριλίου) και 14L:10D το καλοκαίρι (1 Μαΐου – 30 Σεπτεμβρίου). Η αλατότητα ήταν σταθερή στο 35-36‰ και ο κορεσμός του νερού σε οξυγόνο μεγαλύτερος από 90%. Η διατροφή τους περιλάμβανε κυρίως ζωντανά ολοθούρια και νωπά ψάρια.

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1. Γονιμοποίηση

Η γονιμοποίηση ήταν εσωτερική (σύζευξη). Παρατηρήθηκαν συνολικά 19 περιστατικά σύζευξης. Το αρσενικό άτομο εισήγαγε το πέος του στο γονοπόρο που βρίσκεται στην μανδουακή κοιλότητα του θηλυκού, από τη πλευρά του εξωτερικού χείλους του κελύφους (Εικ. 28). Το αρσενικό άτομο ήταν προσκολλημένο πάνω στο θηλυκό, στην δεξιά πλευρά, κοντά στο εξωτερικό χείλος, ενώ το θηλυκό είτε ήταν προσκολλημένο στα τοιχώματα της δεξαμενής είτε βρισκόταν στον πυθμένα. Όλα τα περιστατικά σύζευξης παρατηρήθηκαν τις πρωινές ώρες και διαρκούσαν τουλάχιστον 2 με 4 ώρες. Δυστυχώς δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ακριβής διάρκεια της γονιμοποίησης, καθώς πιθανότατα ξεκινούσε κατά τη διάρκεια της νύχτας και γινόταν αντιληπτή νωρίς το πρωί. Είναι επίσης πιθανό να μην καταγράφηκαν όλα τα περιστατικά σύζευξης αν αυτά ξεκινούσαν και ολοκληρώνονταν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η εναπόθεση εμβρυικών σάκων παρατηρήθηκε από 3 μέχρι 95 μέρες μετά τη σύζευξη, ενώ παρατηρήθηκε σύζευξη αρσενικού ατόμου με θηλυκό που είχε ήδη εναποθέσει εμβρυικούς σάκους (Εικ. 29).

Σε τρεις περιπτώσεις παρατηρήθηκε το ίδιο θηλυκό άτομο να ζευγαρώνει με διαφορετικά αρσενικά άτομα σε διαφορετικές χρονικά στιγμές. Σε μία περίπτωση παρατηρήθηκε ταυτόχρονη σύζευξη ενός θηλυκού ατόμου με δύο αρσενικά. Το θηλυκό βρισκόταν στον πυθμένα της δεξαμενής με τα δύο αρσενικά άτομα προσκολλημένα πάνω του να έχουν εισάγει τα πέη τους στην μανδουακή κοιλότητα του θηλυκού. (Εικ. 30). Το φαινόμενο παρατηρήθηκε νωρίς το πρωί και διήρκησε για 135 λεπτά.



Εικ. 28: Γονιμοποίηση ενός θηλυκού ατόμου *Charonia seguenzae* (Κάτω αριστερά) από ένα αρσενικό άτομο (Πάνω δεξιά).



Εικ. 29: Γονιμοποίηση ενός θηλυκού ατόμου *Charonia seguenzae* που έχει ήδη εναποθέσει και φροντίζει εμβρυικούς σάκους.



Εικ. 30: Ταυτόχρονη γονιμοποίηση ενός θηλυκού απόμου (πάνω, φέρει τον αριθμό 50 χαραγμένο στο κέλυφός του) από δύο αρσενικά άτομα *Charonia sequeenzae* (κάτω). Με κόκκινο βέλος σημειώνονται τα πέη των αρσενικών που διεισδύουν στο γεννητικό πόρο του θηλυκού.

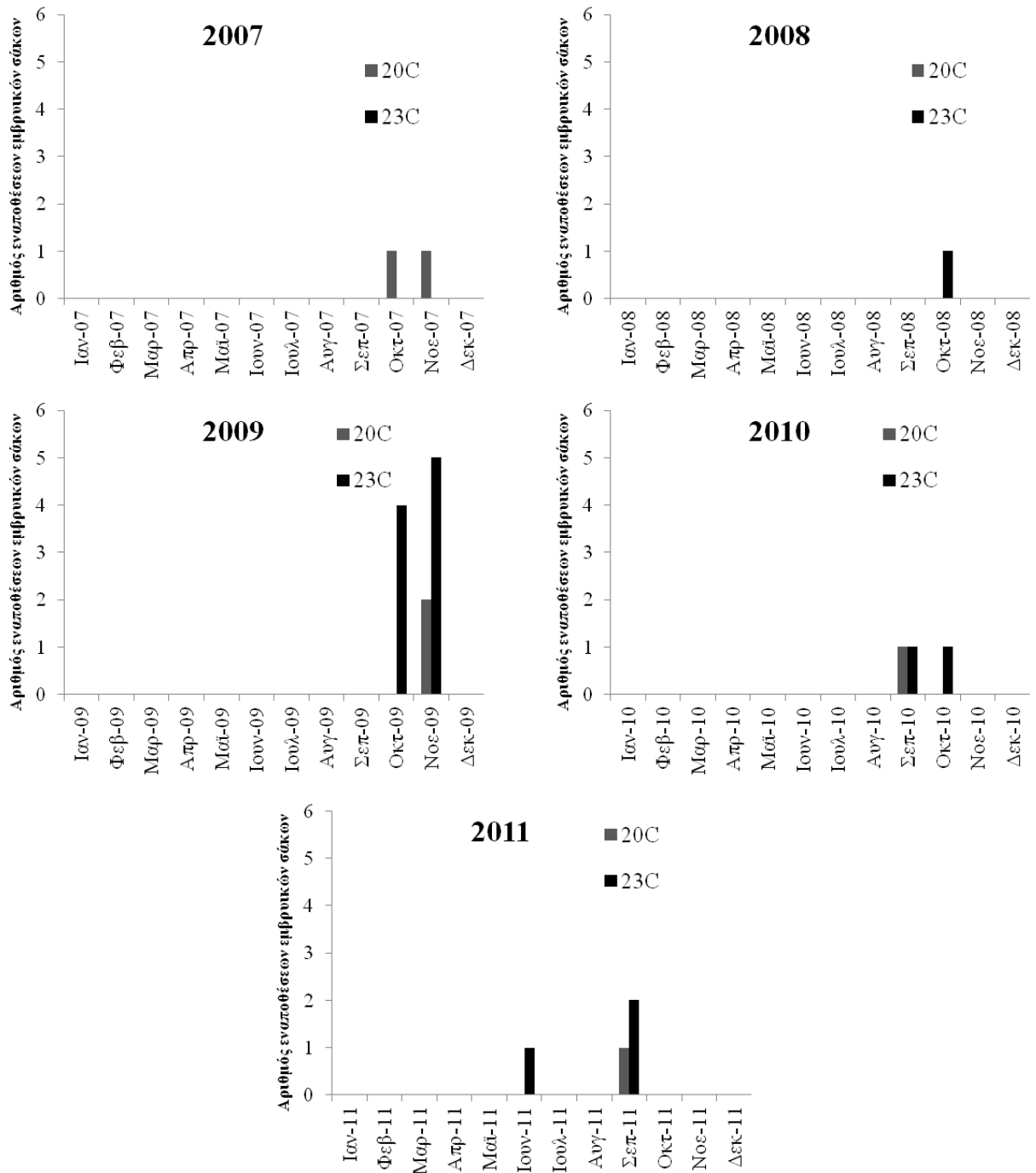
4.3.2. Εναπόθεση εμβρυικών σάκων και μητρική συμπεριφορά

Το διάστημα 2007-2011 παρατηρήθηκαν και μελετήθηκαν 21 εναποθέσεις εμβρυικών σάκων. Από αυτές οι 6 πραγματοποιήθηκαν από θηλυκά άτομα που διατηρούνταν στους 20 °C και 15 από άτομα που διατηρούνταν στους 23 °C (Εικ. 31). Δεν παρατηρήθηκε αναπαραγωγή στα άτομα που είχαν μεταφερθεί στους 17 °C την περίοδο 2010-2011. Εκτός από ένα περιστατικό όπου καταγράφηκε εναπόθεση εμβρυικών σάκων τον Ιούνιο (2011) όλα τα άλλα γεγονότα εναπόθεσης σάκων ξεκινούσαν κατά τους μήνες Σεπτέμβριος-Νοέμβριος ανεξαρτήτου θερμοκρασίας (Εικ. 31).

Η εναπόθεση των εμβρυικών σάκων παρατηρήθηκε 3-95 ημέρες μετά την σύζευξη. Τα θηλυκά άτομα προσκολλούσαν εμβρυικούς σάκους που περιείχαν τα αναπτυσσόμενα έμβρυα στα τοιχώματα της δεξαμενής (Εικ. 32). Η εναπόθεση ήταν σταδιακή και οι εμβρυικοί σάκοι προσκολλούνταν σε στέρεο υπόστρωμα σε ομάδες. Η εναπόθεση της κάθε ομάδας σάκων διαρκούσε 1-4 ημέρες ενώ μεταξύ των διαφορετικών ομάδων μεσολαβούσαν 1-24 ημέρες. Οι σάκοι προσκολλούνταν άναρχα ο ένας δίπλα στον άλλο. Οι διαφορετικές ομάδες τοποθετούνταν είτε δίπλα στην προηγούμενη ομάδα, είτε ανάμεσα στους σάκους της προηγούμενης ομάδας, είτε σε διαφορετικό σημείο της δεξαμενής.

Τα θηλυκά άτομα του είδους *Charonia sequeenzae* εκδήλωσαν έντονη μητρική φροντίδα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου που οι εμβρυικοί σάκοι ήταν

προσκολλημένοι στα τοιχώματα της δεξαμενής. Η μητρική φροντίδα συνίστατο στην συνεχή κίνηση της μητέρας πάνω στους εμβρυικούς της σάκους με σκοπό να τους προστατεύει και να τους καθαρίζει. Για τον καθαρισμό των σάκων οι μητέρες χρησιμοποιούσαν την εκτατή προβοσκίδα τους, με την οποία ‘έγλειφαν’ τους σάκους (Εικ. 33). Η παραμονή των μητέρων πάνω στους σάκους ήταν συνεχής, από την εναπόθεση μέχρι την εκκόλαψη, με μικρά διαλείμματα διάρκειας από 1 ώρα έως 3 ημέρες να παρατηρούνται σποραδικά. Τα περισσότερα από αυτά τα διαλείμματα πραγματοποιήθηκαν κατά τη χορήγηση τροφής, καθώς οι μητέρες απομακρύνονταν από τους σάκους για να τραφούν. Εκτός από τις μητέρες, στις 16 από τις 21 (76%) εναποθέσεις που μελετήθηκαν καταγράφηκε η παρουσία άλλων ατόμων της ίδιας δεξαμενής πάνω στους εμβρυικούς σάκους (Εικ. 34). Η παρουσία των άλλων ατόμων δεν ήταν συνεχής, η διάρκειά της κυμαινόταν μεταξύ 1-3 ημέρες ενώ παρατηρήθηκαν από 1-5 παρουσίες άλλων ατόμων πάνω στους εμβρυικούς σάκους κατά τη διάρκεια της επώασης. Σε δυο περιπτώσεις, ένα αρσενικό άτομο που παρατηρήθηκε να ζευγαρώνει με τη μητέρα μετά την πρώτη εναπόθεση εμβρυικών σάκων, παρατηρήθηκε να φροντίζει τους σάκους χρησιμοποιώντας την προβοσκίδα του όπως το θηλυκό (Εικ. 35). Σε δύο περιπτώσεις που δύο θηλυκά άτομα εναπόθεταν την ίδια περίοδο εμβρυικούς σάκους στην ίδια δεξαμενή παρατηρήθηκε η ταυτόχρονη φροντίδα όλων των σάκων και από τα δύο άτομα. Τα θηλυκά κινούνταν εναλλάξ πάνω στις δύο συστάδες σάκων, φροντίζοντας μία τους δικούς τους και μία τους ξένους σάκους.



Εικ. 31: Εναπόθεση εμβρυϊκών σάκων σε ετήσια βάση για τα έτη 2007-2011 σε δύο διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες (20 και 23 °C).



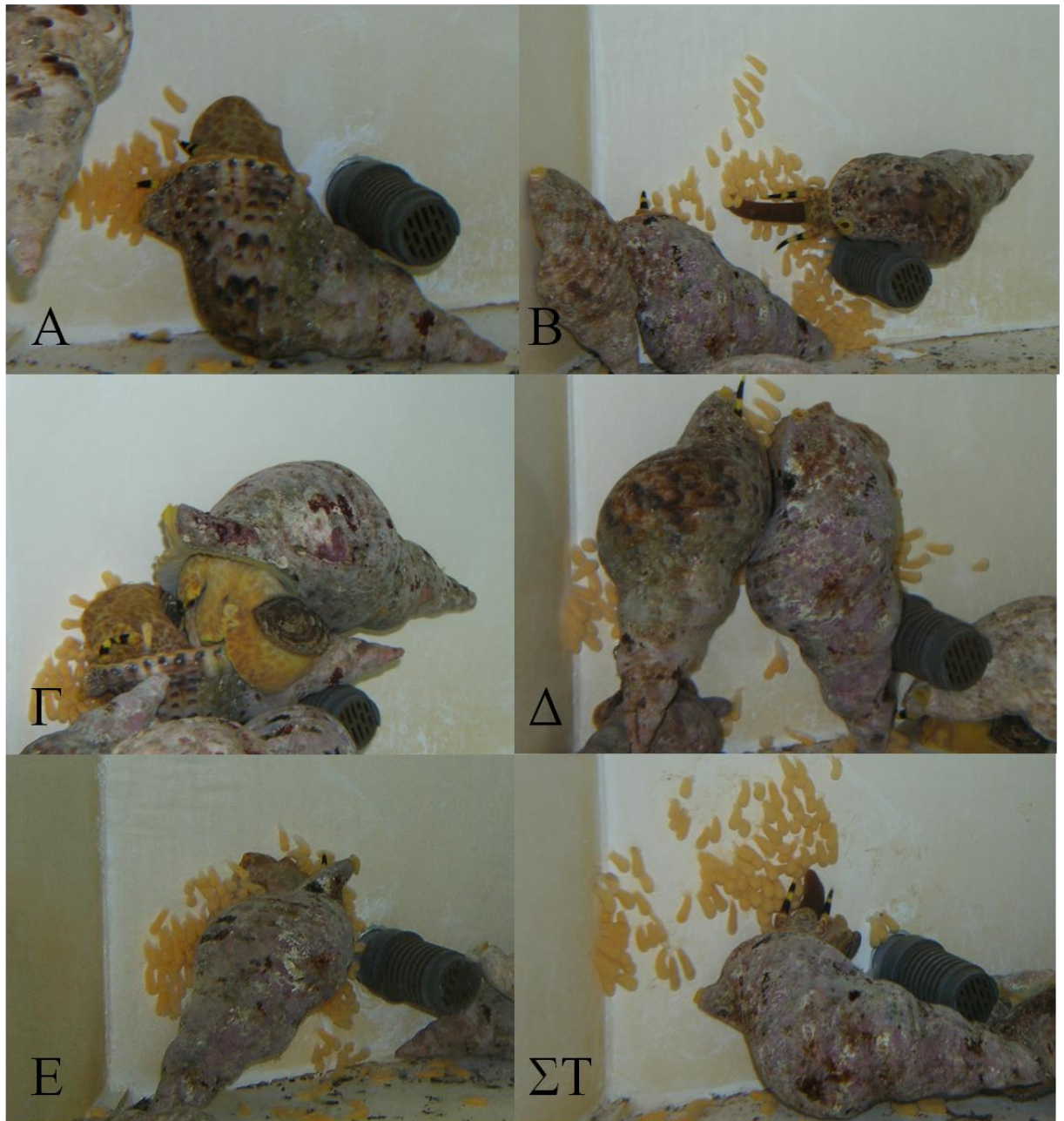
Εικ. 32: Εναπόθεση εμβρυικών σάκων και προσκόλλησή τους στο τοίχωμα δεξαμενής από θηλυκό άτομο *Charonia seguenzae*.



Εικ. 33: Θηλυκό άτομο *Charonia seguenzae* που φροντίζει και καθαρίζει τους εμβρυικούς του σάκους χρησιμοποιώντας την προβοσκίδα του.



Εικ. 34: Παρουσία ατόμων πάνω στους εμβρυικούς σάκους εκτός του θηλυκού ατόμου που τους έχει εναποθέσει.



Εικ. 35: Α) Η μητέρα εναποθέτει τους εμβρυικούς σάκους. Β) Η μητέρα χρησιμοποιεί την προβοσκίδα της για να καθαρίσει τους εμβρυικούς σάκους. Γ) Αρσενικό άτομο (Πάνω) γονιμοποιεί το θηλυκό που εναπόθετε σάκους (Κάτω) Δ) Το θηλυκό (Αριστερά) και το αρσενικό άτομο (Δεξιά) πάνω στους εμβρυικούς σάκους. Ε) Το αρσενικό άτομο πάνω στους εμβρυικούς σάκους. ΣΤ) Το αρσενικό άτομο καθαρίζει τους εμβρυικούς σάκους χρησιμοποιώντας την προβοσκίδα του.

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι τρίτωνες, *Charonia seguenzae*, είναι γονοχωριστικό είδος και αναπαράγονται με εσωτερική γονιμοποίηση των θηλυκών ατόμων μέσω σύζευξης. Οι λίγες αναφορές που σχετίζονται με τη συμπεριφορά σύζευξης στα μέσο- και νεο-γαστερόποδα υποδεικνύουν ότι τα θηλυκά άτομα έχουν παθητικό ρόλο καθώς παρέμειναν προσκολλημένα στο υπόστρωμα ή «αναπαύονταν» στον πυθμένα της δεξαμενής, με τα αρσενικά άτομα να προσκολλούνται πάνω τους (Wells, 1970, Chess & Rosenthal, 1971, Laxton, 1971, παρούσα μελέτη). Το σημείο προσκόλλησης, στην δεξιά πλευρά των θηλυκών δίπλα στο εξωτερικό χείλος, τους παρέχει εύκολη πρόσβαση στο θηλυκό γονοπόρο. Αντίστοιχο φαίνεται να είναι και το πρότυπο γονιμοποίησης που ακολουθούν άλλα μέλη του ίδιου γένους, όπως τα *Charonia rubicunda* (Laxton, 1969), *Charonia tritonis* (Berg, 1971, Zhang *et al.*, 2013) και *Charonia variegata* (Percharde, 1972) αλλά και είδη που ανήκουν στην ίδια οικογένεια όπως τα *Cabestana spengleri*, *Monoplex australasiae* και *Mayena astralasia* (Laxton, 1969) χωρίς όμως να περιγράφεται αναλυτικά. Η σύζευξη παρατηρήθηκε νωρίς το πρωί και λαμβάνοντας υπόψη ότι καταγράφηκαν περισσότερες εναποθέσεις εμβρυικών σάκων απ' ό,τι οι καταγεγραμμένες συζεύξεις, πιθανότατα ξεκίνησε κατά τη διάρκεια της νύχτας και διήρκησε τουλάχιστον 2 με 4 ώρες. Σύζευξη κατά τη διάρκεια της νύχτας παρατηρήθηκε και στους τρίτωνες του είδους *Charonia tritonis* η οποία διήρκησε για αρκετές ώρες (Zhang *et al.*, 2013). Η διάρκεια της σύζευξης στα γαστερόποδα ποικίλει από λίγα λεπτά, 5-10 min για το *Littorina pintado* (Struhsaker, 1966), έως και 15 ώρες για το *Littorina obtusata* (Ankel, 1936).

Τα θηλυκά άτομα του είδους *Charonia seguenzae* συζεύχθηκαν περισσότερες από μία φορές, με περισσότερα του ενός αρσενικά, πριν και κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης των εμβρυικών σάκων. Σύζευξη θηλυκών ατόμων κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης των εμβρυικών σάκων έχει αναφερθεί και σε άλλα γαστερόποδα όπως το *Kelletia kelletii* (Rosenthal, 1970) αλλά και τα συγγενικά *Charonia rubicunda* (Laxton, 1971) και *Charonia tritonis* (Zhang *et al.*, 2013). Η πολλαπλή σύζευξη θηλυκών με περισσότερα του ενός αρσενικά έχει καταγραφεί για άλλα είδη γαστεροπόδων όπως τα *Charonia tritonis*, *Cabestana spengleri*, *Kelletia kelletii*, *Littorina saxatilis*, *Crepidula coquimbensis*, *Busycon carica*, *Rapana venosa*

(Rosenthal, 1970, Laxton, 1971, Walker *et al.*, 2006, Makinen *et al.*, 2007, Brante *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2013, Xue *et al.*, 2014). Αν και ο Laxton (1971) αναφέρεται στην ύπαρξη ανταγωνισμού μεταξύ δύο αρσενικών ατόμων του είδους *Cabestana spengleri* που προσπαθούν να ζευγαρώσουν με το ίδιο θηλυκό, η ταυτόχρονη σύζευξη ενός θηλυκού ατόμου με δύο αρσενικά αποτελεί μοναδικό μέχρι σήμερα καταγεγραμμένο περιστατικό. Οι μόνες αναφορές για ταυτόχρονη σύζευξη περισσοτέρων των δύο γαστεροπόδων αφορά στις αλυσίδες 3 έως 6 ατόμων που σχηματίζουν ερμαφρόδιτα γαστερόποδα του γένους *Aplysia* όπου το πρώτο άτομο ζευγαρώνει μόνο σαν θηλυκό άτομο και το τελευταίο μόνο ως αρσενικό με τα ενδιάμεσα άτομα της αλυσίδας να ζευγαρώνουν λαμβάνοντας και δίδοντας σπέρμα ταυτόχρονα (Pennings, 1991).

Η σύζευξη θηλυκών ατόμων του είδους *Charonia sequeenzae* με περισσότερα του ενός αρσενικά γεννά το ερώτημα της πιθανής πολλαπλής πατρότητας των απογόνων. Η πολυγαμικότητα των θηλυκών και η πολλαπλή πατρότητα των απογόνων ενός θηλυκού έχει παρατηρηθεί σε αρκετά ζώα (Uller & Olsson, 2008) και μπορεί να εντείνει το φαινόμενο της «φυλοεπιλογής» (sexual selection: Freeman & Herron, 2003, Futuyma, 2005). Πρόκειται για την μορφή φυσικής επιλογής που δρα διαφορετικά στα δύο φύλα και αποτελεί πολύ ισχυρή επιλεκτική δύναμη η οποία οδηγεί σε διαφοροποίηση των δύο φύλων. Το θηλυκό άτομο, το οποίο, στην περίπτωση αυτή, παράγει σχετικά περιορισμένο αριθμό ωαρίων, «επιδιώκει» να γονιμοποιηθούν όσο το δυνατό περισσότερα ωάρια του από τα πιο αρμοσμένα (fitter) αρσενικά. Τα αρσενικά, από την άλλη, «επιδιώκουν» να γονιμοποιήσουν όσο το δυνατό περισσότερα ωάρια. Σε περιπτώσεις πολλαπλών συζεύξεων του θηλυκού εμφανίζονται εξαιρετικές και ποικίλες συμπεριφορές στα αρσενικά προκειμένου να εξασφαλίσουν την γονιμοποίηση του θηλυκού από το δικό τους σπέρμα (Freeman & Herron, 2003, Futuyma, 2005). Οι συμπεριφορές αυτές μπορεί να εκφραστούν σε διάφορα επίπεδα: (α) με προφύλαξη των θηλυκών για να μη ζευγαρώσουν με άλλα αρσενικά, (β) με απελευθέρωση χημικών ουσιών που καταστρέφουν το σπέρμα του προηγούμενου αρσενικού, ή μειώνουν την επιθυμία του θηλυκού για παραπάνω διασταυρώσεις, ή ακόμα (γ) με ανάπτυξη ειδικών οργάνων που απομακρύνουν το σπέρμα του προηγούμενου αρσενικού από τη σπερματοθήκη του θηλυκού. Στην περίπτωση που δεν μπορεί να αποτραπεί το σπέρμα ενός αρσενικού από κάποιο άλλο να εισέλθει στο θηλυκό, δημιουργείται ανταγωνισμός σπέρματος μέσα στο θηλυκό, ο οποίος «καθοδηγείται» τόσο από την ποσότητα όσο και από την ποιότητα του

σπέρματος των διάφορων αρσενικών στην προσπάθειά τους να γονιμοποιήσουν ένα πολυγαμικό θηλυκό. Μελέτες που αφορούν στην πατρότητα και τον ανταγωνισμό σπέρματος στα θαλάσσια γαστερόποδα βασιζόμενες στην ανάλυση μικροδορυφορικών τόπων έχουν δείξει ότι η πολυανδρία είναι ένα αρκετά κοινό φαινόμενο στα γαστερόποδα (Xue *et al.*, 2014). Στα μελετημένα είδη (*Littorina saxatilis*, *Crepidula coquimbensis*, *Busycon carica*, *Rapana venosa*, κ.α.), τα γονιμοποιημένα από περισσότερα από ένα αρσενικά άτομα ανέρχονταν στο 76%-100% του συνόλου των θηλυκών που μελετήθηκαν (Walker *et al.*, 2006, Makinen *et al.*, 2007, Brante *et al.*, 2011, Xue *et al.*, 2014). Για την εξακρίβωση όμως της ύπαρξης πολλαπλής πατρότητας και του βαθμού της στο *Charonia sequestrata* πρέπει να πραγματοποιηθούν αντίστοιχες αναλύσεις γενετικών τόπων.

Οι τρίτωνες του είδους *Charonia sequestrata* γεννούν τα αυγά τους μέσα σε προστατευτικές κάψουλες, τους εμβρυικούς σάκους, τις οποίες τα θηλυκά άτομα προσκολλούν στο υπόστρωμα. Η εναπόθεση των σάκων έλαβε χώρα 3-95 ημέρες μετά τη σύζευξη υποδηλώνοντας ότι τα θηλυκά άτομα μπορούν να αποθηκεύσουν σπέρμα για τρεις μήνες. Η αποθήκευση σπέρματος στα γαστερόποδα αποτελεί πολύ κοινό φαινόμενο (Fretter, 1984, Webber, 1977) με τη μέγιστη καταγεγραμμένη διάρκεια στο *Oncomelania formosana* να φτάνει τους 18 μήνες (Roth, 1960).

Στο βόρειο ημισφαίριο, τα προσοβράγχια συνήθως γεννάνε κατά τη διάρκεια της θερμής περιόδου του χρόνου, συχνά κατά τη διάρκεια μιας εκτενούς περιόδου κατά την οποία παρατηρούνται πολλαπλές συζεύξεις και γέννες (Hyman, 1967). Οι αναφορές για άλλα μέλη της οικογένειας Ranellidae αφορούν είδη που απαντούν στο Νότιο ημισφαίριο. Στη Νέα Ζηλανδία η ωοτοκία των Ranellidae ποικίλει χρονικά καλύπτοντας σχεδόν ολόκληρο το έτος, με το *Cabestana spengleri* να ωοτοκεί μεταξύ Νοεμβρίου και Ιανουαρίου, το *Monoplex australasiae* μεταξύ Ιανουαρίου και Μαρτίου, το *Mayena astralasia* μεταξύ Μαΐου και Αυγούστου και του *Charonia rubicunda* μεταξύ Αυγούστου και Σεπτεμβρίου (Laxton, 1969), ενώ στα στενά του Μαγγελάνου το *Fusitriton magellanicus* ωοτοκεί μεταξύ Οκτωβρίου και Νοεμβρίου (Canete *et al.*, 2012). Οι τρίτωνες *Charonia sequestrata* στους οποίους η έναρξη της εναπόθεσης εμβρυικών σάκων, εκτός μίας περίπτωσης που παρατηρήθηκε τον Ιούνιο, τοποθετείται ημερολογιακά μεταξύ Σεπτεμβρίου και Νοεμβρίου και μόνο στις θερμοκρασιακές συνθήκες των 20 και 23°C. Οι πλειονότητα των εναποθέσεων παρατηρήθηκε στους 23°C ενώ στους 17°C δεν παρατηρήθηκε καμία εναπόθεση εμβρυικών σάκων.

Ερωτήματα εγείρονται σχετικά με τον λόγο για τον οποίο οι τρίτωνες, παρά το γεγονός ότι διατηρούνται σε καθεστώς σταθερής θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, αναπαράγονται την συγκεκριμένη εποχή κάθε χρόνο. Λίγα πράγματα είναι γνωστά για τους παράγοντες που προκαλούν την αναπαραγωγή στα γαστερόποδα. Η θερμοκρασία φαίνεται ότι είναι ένας από αυτούς τους παράγοντες, με την άνοδο της θερμοκρασίας να προκαλεί την ωοτοκία σε κάποια Trochidae (Hyman, 1967). Αν και η θερμοκρασία στα ενυδρεία που διατηρούνταν οι πληθυσμοί των τριτώνων διατηρήθηκε σταθερή, υπήρξαν διακυμάνσεις της τάξης του 0.5°C, με την θερμοκρασία να μειώνεται μετά τον Σεπτέμβριο. Πιθανώς αυτή η μικρή αλλαγή στη θερμοκρασία να είναι ικανή να προκαλέσει την ωοτοκία, καθώς έχει παρατηρηθεί μικρές θερμοκρασιακές αλλαγές να επηρεάζουν την εκδήλωση ωοτοκίας σε Trochidae του γένους *Gibbula* (Ducros, 1957). Θα μπορούσε να συνδεθεί η μικρή πτώση της θερμοκρασίας που παρατηρήθηκε στις δεξαμενές με την πτώση που λαμβάνει χώρα την ίδια περίοδο στο φυσικό περιβάλλον. Η μέγιστη μέση επιφανειακή θερμοκρασία στην Ανατολική Μεσόγειο καταγράφεται τον Αύγουστο και ξεπερνά τους 24°C και στη συνέχεια φθίνει μέχρι τους 20°C τον Νοέμβριο (Poulos *et al.*, 1997). Αν και δεν υπάρχουν αναφορές που αφορούν στην εναπόθεση εμβρυικών σάκων του *Charonia sequezea* στο φυσικό περιβάλλον, η έντονη εποχικότητα που εμφανίζουν οι τρίτωνες και η ταύτιση του θερμοκρασιακού εύρους στο οποίο παρατηρείται ωοτοκία σε συνθήκες αιχμαλωσίας με τις θερμοκρασίες που παρατηρούνται στο φυσικό περιβάλλον την ίδια εποχή, καθιστούν βάσιμη την υπόθεση ότι και στο φυσικό περιβάλλον η ωοτοκία των τριτώνων λαμβάνει χώρα την ίδια περίοδο.

Οι τρίτωνες *Charonia sequezea* εμφάνισαν ένα ιδιαίτερο πρότυπο προστασίας και φροντίδας των εμβρυικών σάκων που θα μπορούσε να χωριστεί σε δύο επίπεδα. Στο πρώτο επίπεδο κατατάσσεται η μητρική φροντίδα. Η πιο έντονη παροχή προστασίας προερχόταν από την μητέρα, η οποία παρέμενε πάνω στους σάκους σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης των εμβρύων προστατεύοντάς τους και καθαρίζοντάς τους με τη βοήθεια της προβοσκίδας της. Η παροχή μητρικής φροντίδας είναι κοινό φαινόμενο ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας Ranellidae (Laxton, 1971, Govan, 1995) και στοχεύει στην βελτίωση της επιβίωσης των εμβρύων και στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας και καλύτερης ποιότητας νυμφών (Gallardo *et al.*, 2012).

Στο δεύτερο επίπεδο κατατάσσεται η προστασία των εμβρυικών σάκων από άλλα άτομα που βρίσκονται στην ίδια δεξαμενή. Κάποια από αυτά θα μπορούσε να είναι πιθανοί πατέρες (αρσενικά που συζεύχθηκαν με τη μητέρα). Το πρότυπο αυτό εμφανίστηκε σε δύο περιπτώσεις και συνίστατο όχι μόνο στην παραμονή του αρσενικού πάνω στους σάκους αλλά και στον καθαρισμό τους με τη χρήση της προβοσκίδας του. Αντίστοιχα φαινόμενα περιστασιακής φροντίδας από φερόμενους ως πατέρες αναφέρονται και για το συγγενικό *Cabestana spengleri* αλλά δεν υπάρχουν αναφορές για τα υπόλοιπα μελετημένα Ranellidae (Laxton, 1971). Αν και τα αρσενικά δεν παρέχουν συνήθως γονική φροντίδα στους απογόνους τους, υπάρχουν είδη, όπως το *Solenosteira macrospira*, που το αρσενικό άτομο φροντίζει αποκλειστικά τους εμβρυικούς σάκους οι οποίοι είναι προσκολλημένοι στο κέλυφος του (Kamel & Grosberg, 2012). Το αρσενικό που εμφάνισε πατρική φροντίδα ήταν το τελευταίο αρσενικό που συζεύχθηκε με το θηλυκό, το οποίο είχε ήδη εναποθέσει εμβρυικούς σάκους και αποτελεί πιθανό πατέρα των επόμενων εμβρυικών σάκων αλλά εξαιτίας της πολυανδρίας που εμφανίζουν τα θηλυκά άτομα είναι πιθανό να μην είναι ο μοναδικός. Παρά το γενικό πρότυπο σύμφωνα με το οποίο όσο πιο πεπεισμένο είναι ένα αρσενικό για την πατρότητα των απογόνων ενός θηλυκού τόσο πιο πρόθυμο είναι να επενδύσει στην φροντίδα τους (Clutton-Brock, 1991), υπάρχουν είδη που τα αρσενικά παρέχουν φροντίδα σε απογόνους πολύανδρων θηλυκών, όπως το *Solenosteira macrospira*, και έχουν μικρό ποσοστό πατρότητας (Kamel & Grosberg, 2012).

Εκτός από τους πιθανούς πατέρες, υπήρχαν και θηλυκά άτομα που ενώ δεν είχαν δεσμούς συγγένειας με τα αναπτυσσόμενα έμβρυα τους παρείχαν φροντίδα. Στην ίδια κατηγορία ανήκει και η κοινή φροντίδα δύο συστάδων εμβρυικών σάκων από τις μητέρες τους. Παρόμοια συμπεριφορά έχει καταγραφεί και για το *Cabestana spengleri* στο φυσικό περιβάλλον (Laxton, 1971). Τα θηλυκά άτομα των οποίων οι εμβρυικοί σάκοι έχουν εκκολαφθεί, προσεγγίζουν κοντινά θηλυκά άτομα των οποίων οι σάκοι δεν έχουν εκκολαφθεί και παραμένουν μαζί τους βοηθώντας τα κατά την επώαση. Αν και δεν έχει περιγραφεί σε άλλα γαστερόποδα το φαινόμενο της συνεργατικής επώασης (cooperative breeding) έχει παρατηρηθεί σε άλλα τάξα, όπως τα ψάρια, τα πτηνά και τα θηλαστικά (Bergmuller *et al.*, 2007). Τα πλεονεκτήματα αυτής της στρατηγικής μπορεί να είναι είτε έμμεσα, με τους βοηθούς να αυξάνουν την αρμοστικότητα τους βοηθώντας στενούς συγγενείς να αυξήσουν τον αριθμό των γονιδίων τους στις επόμενες γενιές, είτε άμεσα, με τους βοηθούς να αυξάνουν τις

πιθανότητες αναπαραγωγής τους (Emlen, 1991, Cockburn, 1998, Hatchwell & Komdeur, 2000, Gilchrist, 2007). Στην περίπτωση των τριτώνων, αν και δεν είναι γνωστός ο βαθμός συγγένειας μεταξύ των ατόμων, η πιθανότητα στενής συγγένειας είναι περιορισμένη καθώς τα άτομα του πληθυσμού προέρχονται από μία ευρεία περιοχή που καλύπτει τις βορειοανατολικές ακτές της Κρήτης.

Η παρούσα μελέτη παρέχει σημαντικές πληροφορίες που αφορούν στην βιολογία, συμπεριφορά και οικολογία των τριτώνων, όπως το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο αναπαράγονται και η εκδήλωση γονικής φροντίδας. Επιπροσθέτως, η μελέτη της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς των τριτώνων αποκάλυψε δύο μέχρι σήμερα άγνωστες πτυχές της βιολογίας τους, την πολυανδρία που εμφανίζουν τα θηλυκά άτομα, και την εκδήλωση συνεργατικής φροντίδας των εμβρυικών σάκων που θέτει νέα ερωτήματα τόσο σε οικολογικό, όσο και εξελικτικό επίπεδο. Γενετικές αναλύσεις που αφορούν την πατρότητα των απογόνων και την γενετική σύνθεση και το βαθμό συγγένειας των ατόμων του πληθυσμού θα μπορούσαν να δώσουν απαντήσεις στα ερωτήματα που τίθενται παραπάνω και αποτελούν μελλοντικό στόχο. Τα αποτελέσματα μπορούν να βοηθήσουν τόσο στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των φυσικών πληθυσμών με στόχο την οικολογική αποκατάσταση των φυσικών πληθυσμών όσο και στην εκτροφή του είδους σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

5. Επίδραση της θερμοκρασίας και του μεγέθους της μητέρας στην γονιμότητα και την εμβρυική ανάπτυξη.

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα περισσότερα μεσογαστερόποδα, συμπεριλαμβανομένων όλων των Ranellidae, τοποθετούν τα αυγά τους σε κάψουλες (Laxton, 1969, Fretter, 1984, Pechenik, 1986, Gallardo *et al.*, 2012, Canete *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013) η υφή των οποίων ποικίλλει από μαλακή-ζελατινώδη έως σκληρή (Hyman, 1967, Gallardo *et al.*, 2012, Canete *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013) ενώ και το σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό, οβάλ, κωνοειδές, ροπαλόμορφο κ.α. Τα θηλυκά άτομα εναποθέτουν τις κάψουλες σε ομάδες ή συστάδες που προσκολλούνται στο υπόστρωμα μέσω μιας διευρυμένης βάσης. Ο εγκλεισμός των αυγών σε κάψουλες παρέχει προστασία από την θήρευση (Pechenik 1979, Perron 1981), βακτηριακές μολύνσεις (Lord 1986), οσμωτικό σοκ (Pechenik 1982, 1983, Hawkins & Hutchinson 1988), αποξήρανση (Spight 1977, Pechenik 1978), θερμοκρασιακό σοκ (Spight 1977, Pechenik 1986), τη δράση των κυμάτων (Perron 1981) και την υπεριώδη ακτινοβολία (Rawlings, 1996).

Τα βενθικά θαλάσσια ασπόνδυλα - μεταξύ αυτών και τα προσοβράγχια γαστερόποδα - εμφανίζουν δυο βασικά πρότυπα ανάπτυξης. Στο πρώτο, η ανάπτυξη είναι άμεση και από τους εμβρυικούς σάκους προκύπτουν νεαρά άτομα μορφολογικά όμοια με τα ενήλικα ενώ στο δεύτερο παράγεται μια πλαγκτονική νύμφη η οποία πρέπει να περάσει από το στάδιο της μεταμόρφωσης για να μπορέσει να εγκατασταθεί στο βένθος (Christiansen & Fenchel, 1979). Τα μέλη της οικογένειας Ranellidae εμφανίζουν το δεύτερο πρότυπο ανάπτυξης, με πολλούς να αποδίδουν την ευρεία γεωγραφική τους εξάπλωση στην ύπαρξη μιας πλαγκτονικής νύμφης με μεγάλη διάρκεια πλαγκτονικής ζωής (Scheltema, 1966, Bandel *et al.*, 1994, Govan, 1995, Strathmann & Strathmann, 2007). Αυτή η αναπτυξιακή στρατηγική βασίζεται στην βελτιστοποίηση του αριθμού των νυμφών που παράγονται ανά φωτοκία και την βελτίωση της πιθανότητας επιβίωσης τόσο πριν την εκκόλαψη αλλά και κατά τη διάρκεια του πλαγκτονικού σταδίου (Laxton, 1969, Govan, 1995, Pechenik *et al.*,

1984, Bandel *et al.*, 1994, Zhang *et al.*, 2013). Στη βελτίωση της επιβίωσης και της ποιότητας των πλαγκτονικών νυμφών συνεισφέρει και η εκδήλωση γονικής φροντίδας που εμφανίζουν αρκετά Ranellidae (Laxton, 1969, Govan, 1995, Zhang *et al.*, 2013, παρούσα μελέτη).

Η γονιμότητα των θηλυκών και η ανάπτυξη των εμβρύων είναι δύο παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό και την ποιότητα των πλαγκτονικών νυμφών και κατ' επέκταση το βαθμό στρατολόγησης νεαρών ατόμων, που αποτελεί βασικό κρίκο για την διατήρηση ενός είδους. Το μέγεθος της μητέρας αποτελεί έναν από τους παράγοντες που επηρεάζουν την γονιμότητα των θαλάσσιων γαστερόποδων. Η αύξηση της γονιμότητας με την αύξηση του μεγέθους έχει αναφερθεί σε αρκετά γαστερόποδα όπως τα *Thais lamellose* και *T. emarginata* (Spight & Emlen, 1976), *Littorina rudis* (Roberts & Hughes, 1980), *Conus pennaceus* (Perron & Corpuz, 1982), *Polinices pulchellus* (Kingsley-Smith *et al.*, 2003) και *Nassarious reticulatus* (Chatzinikolaou & Richardson, 2010). Τα μεγαλύτερα άτομα του είδους *N. reticulatus* φαίνεται ότι εναποθέτουν μεγαλύτερες κάψουλες που περιέχουν περισσότερα και μεγαλύτερα αυγά.

Ένας άλλος παράγοντας που πιθανώς σχετίζεται με τη γονιμότητα και την εμβρυική ανάπτυξη των τριτώνων είναι η θερμοκρασία. Το *C. seguenzae* είναι ένα είδος που εξαπλώνεται στην Ανατολική Μεσόγειο (Beu, 2010) όπου παρατηρείται έντονη εποχική διακύμανση στην επιφανειακή θερμοκρασία της θάλασσας (Poulos *et al.*, 1997). Στο Αιγαίο, αν το εύρος των τιμών κυμαίνεται από 8 °C στο Βόρειο Αιγαίο το χειμώνα έως 26 °C το καλοκαίρι στο Νοτιοανατολικό Αιγαίο, η μέση διακύμανση της θερμοκρασίας είναι από 14 °C το χειμώνα έως 24 °C το καλοκαίρι (Poulos *et al.*, 1997). Αντίστοιχες μελέτες στη Νοτιοανατολική Μεσόγειο, στην θάλασσα της Λεβαντίνης, αναφέρουν ότι η εποχική διακύμανση της θερμοκρασίας της θάλασσας είναι μικρότερη και κυμαίνεται από 16.8 °C το χειμώνα έως 23.06 °C το καλοκαίρι (Shaltout & Omstedt, 2014). Στην προηγούμενη ενότητα παρατηρήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ωοτοκία, με τους τρίτωνες να εναποθέτουν εμβρυικούς σάκους σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν μεταξύ 20 και 23 °C. Όμως, η θερμοκρασία, εκτός από την αναπαραγωγική περίοδο, μπορεί να επηρεάζει τη γονιμότητα και την εμβρυική ανάπτυξη των τριτώνων.

Η θερμοκρασία είναι παράγοντας που επηρεάζει και την εμβρυική ανάπτυξη των θαλάσσιων οργανισμών (Bourne & Smith, 1972, Landry, 1975, Akesson, 1977, Branford, 1978a,b, Al-Habbib & Grainger, 1981, 1983, Clarke, 1982, Anger, 1983,

1991, Palmegiano & D'Apote, 1983, Pechenik, 1984a,b, Lima & Pechenik, 1985, Blaszkowski & Moreira, 1986, Dawirs & Dietrich, 1986, Bhaud, 1988, Jamieson & Burns, 1988, Hann, 1989, Al-Tikrity & Grainger, 1990, Charmantier & Mounet, 1992). Ο ρυθμός ανάπτυξης στα ασπόνδυλα εμφανίζει θετική συσχέτιση με την θερμοκρασία (Bayne, 1976), αλλά η μέγιστη επιβίωση και η βέλτιστη αύξηση συχνά παρατηρούνται σε ένα περιορισμένο θερμοκρασιακό εύρος. Η έκθεση σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τη βέλτιστη στο δίθυρο *Argopecten irradians* οδήγησαν σε μειωμένο ρυθμό αύξησης (Tettlebach & Rhodes, 1981). Στο *Thais haemastoma canaliculata*, η επιβίωση στην εκκόλαψη ήταν μεγαλύτερη και η ανάπτυξη γρηγορότερη στους 28 °C σε σχέση με τους 22 °C (Roller & Stickle, 1989). Στους εξώθερμους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των θαλάσσιων ασπόνδυλων, η θερμοκρασία εκτός από τον ρυθμό ανάπτυξης επηρεάζει και το μέγεθος των οργανισμών, που σε αντίθεση με το ρυθμό αύξησης, μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Atkinson, 1994, Atkinson & Sibly, 1997). Αυτό αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο φαινόμενο γνωστό ως «κανόνας θερμοκρασίας μεγέθους» (Temperature-Size Rule, TSR).

Αναφορές για την εμβρυική ανάπτυξη των τριτώνων του είδους *Charonia seguenzae* δεν υπάρχουν, αλλά έχει περιγραφεί λεπτομερώς η οντογένεση του συγγενικού *Charonia tritonis* (Zhang *et al.*, 2013), χωρίς όμως να έχουν μελετηθεί οι παράγοντες που την επηρεάζουν. Στόχος αυτής της ενότητας είναι η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας (17, 20, 23°C) και του μεγέθους της μητέρας στην αναπαραγωγική απόδοση των τριτώνων και στην εμβρυική ανάπτυξη.

5.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1. Βιοχημική ανάλυση σάκων

Για τη μελέτη της κατά προσέγγιση βιοχημικής σύστασης των εμβρυικών σάκων των τριτώνων εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 2.2.2.1 σε 250 εμβρυικούς σάκους που προέρχονταν από 5 διαφορετικά θηλυκά άτομα την περίοδο 2009-2010. Δύο ομάδες σάκων προήλθαν από τους 20°C και τρεις από τους 23°C. Οι σάκοι περιείχαν ζωντανά έμβρυα στο στάδιο της πεπλοφόρου νύμφης.

5.2.2. Επίδραση του μεγέθους της μητέρας και της θερμοκρασίας στη γονιμότητα

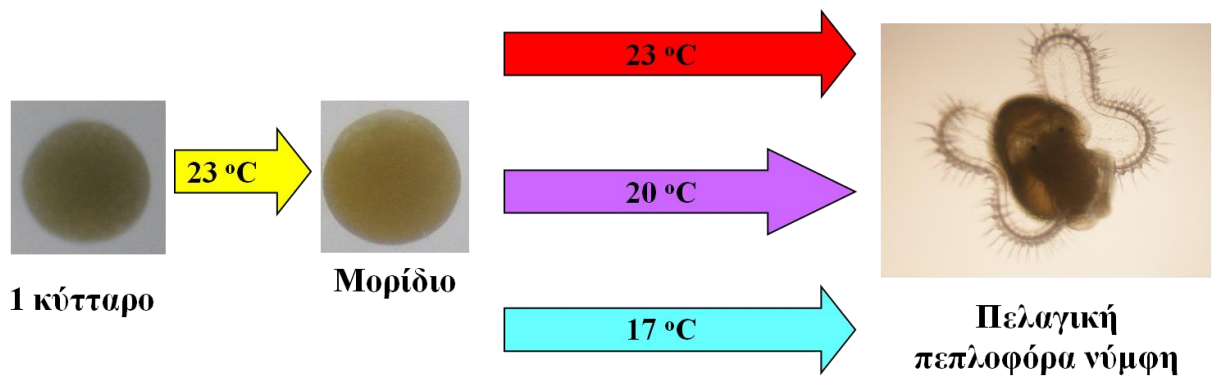
Για την μελέτη της επίδρασης του μεγέθους της μητέρας στη γονιμότητα των τριτώνων εξετάστηκαν οι εναποθέσεις εμβρυικών σάκων 9 θηλυκών ατόμων (Πίνακας 5). Οι εναποθέσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν τα έτη 2010-2014 με 5 από αυτές να παρατηρούνται στους 20 °C και 4 στους 23°C. Εκτός από τα βιομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας, μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός εμβρυικών σάκων που εναποτέθηκαν. Αφού μετρήθηκε το μήκος και το βάρος των σάκων σε τυχαίο δείγμα 5-7 σάκων ανά θηλυκό (που βρίσκονταν στο στάδιο του ενός κυττάρου), οι σάκοι ανοίχτηκαν και τα αυγά φωτογραφήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Ο αριθμός των αυγών ανά εμβρυικό σάκο καθώς και η διάμετρος των αυγών μετρήθηκαν από μικροφωτογραφίες με τη χρήση του λογισμικού ImageJ. Υπολογίστηκαν ο αριθμός αυγών στη μονάδα βάρους (g) του εμβρυικού σάκου, ο συνολικός αριθμός αυγών ανά θηλυκό άτομο, το συνολικό βάρος των σάκων σαν πασοστό (%) του βάρους της μητέρας (SW/BW %) και η συνολική ενέργεια που περιείχαν οι εμβρυικοί σάκοι. Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη γονιμότητα πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της γονιμότητας 6 ατόμων παρόμοιου μεγέθους, τρία ανά θερμοκρασία (Πίνακας 5). Εξαίρεση αποτελεί η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην διάμετρο των αυγών στο στάδιο του ενός κυττάρου. Επειδή δεν υπήρχαν δεδομένα για δύο από τα άτομα που βρίσκονταν στο στάδιο του μοριδίου (C6 2014 και B3 2014), τα άτομα αυτά αποκλείστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από το άτομο C6 2011.

Πίνακας 5: Βιομετρικά στοιχεία των θηλυκών που εναπόθεσαν εμβρυικούς σάκους. Παρατίθενται η δεξαμενή, η χρονολογία και η θερμοκρασία στις οποίες διατηρούνταν καθώς και το βάρος και το μήκος του κελύφους τους. Με * σημειώνονται τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας.

Δεξαμενή	Έτος	Θερμοκρασία (°C)	Βάρος (g)	Μήκος (cm)
B1	2013	20	158.66	13.4
C6	2011	20	258.4	16
C6*	2014	20	302	18.1
C1*	2013	20	355.48	19.3
B3*	2014	20	398.7	21.4
D7*	2011	23	359	19
D3*	2010	23	370	19.5
E4*	2011	23	378.57	18.4
D6	2010	23	958.9	25.6

5.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην εμβρυική ανάπτυξη

Για την περιγραφή της εμβρυϊκής ανάπτυξης του θαλάσσιου γαστερόποδου *Charonia sequezea* στις τρεις θερμοκρασιακές συνθήκες (17, 20 και 23°C), χρησιμοποιήθηκαν 180 εμβρυϊκοί σάκοι που προήλθαν από το ίδιο άτομο (23.1 °C), εναποτέθηκαν την ίδια μέρα και βρίσκονταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο (στάδιο 1 κυττάρου). Όταν τα έμβρυα βρίσκονταν στο στάδιο του βλαστιδίου-γαστριδίου (7^η ημέρα μετά την εναπόθεση –HME) χωρίστηκαν σε ομάδες των 60 σάκων και εγκλιματίστηκαν στους 20 και 17 °C ενώ μια ομάδα σάκων παρέμεινε στους 23 °C (Εικ. 36). Για τη μελέτη της οντογένεσης λαμβάνονταν 2 τυχαία επιλεγμένοι σάκοι από κάθε συνθήκη (κάθε μέρα κατά τη διάρκεια των 5 πρώτων ημερών, κάθε 2 ημέρες από D7 μέχρι τη D17 και κάθε 3 ημέρες από τη D20 μέχρι την εκκόλαψη), ζυγίζονταν, ανοίγονταν και τα αυγά, έμβρυα ή νύμφες φωτογραφίζονταν στο στερεοσκόπιο. Το αναπτυξιακό στάδιο, το μέγεθος και η συμπεριφορά τους μελετήθηκαν *in vivo* και σε μικροφωτογραφίες.



Εικ. 36: Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού. Σάκοι που γεννήθηκαν στο στάδιο του ενός κυττάρου στους 23°C διατηρήθηκαν στην ίδια θερμοκρασία έως το στάδιο του μοριδίου. Έπειτα χωρίστηκαν και εγκλιματίστηκαν (24 ώρες) στους 17, 20 και 23°C όπου και παρέμειναν , μέχρι την εκκόλαψη.

5.2.4. Στατιστική ανάλυση

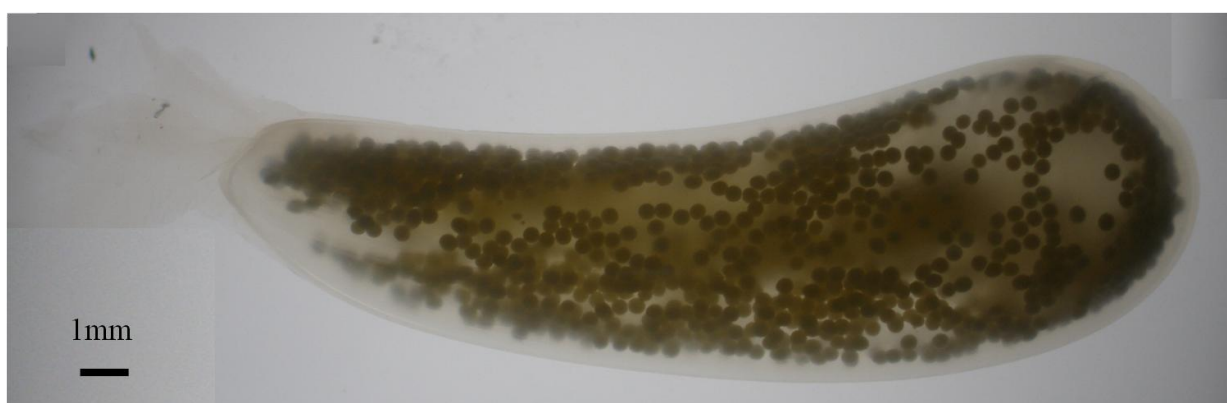
Τα δεδομένα αναλύθηκαν για κανονικότητα (Kolmogorov–Smirnov test) και ισότητα των διασπορών (Bartlett’s test of sphericity). Για να ελεγχθεί αν οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα σε δύο ή περισσότερες ομάδες ήταν στατιστικά σημαντικές πραγματοποιήθηκε t-test ή ανάλυση διασποράς (1-way ANOVA) Όταν δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις για το t-test ή την ανάλυση διασποράς, πραγματοποιούνταν το Mann-Whitney test ή ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis. Όταν οι μέσες τιμές διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) χρησιμοποιούνταν το Tukey’s test (HSD test) για την ανάλυση των διαφορών.

5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1. Εμβρυικοί σάκοι

Οι τρίτωνες *Charonia seguenzae* περικλείουν τα αναπτυσσόμενα έμβρυα μέσα σε εμβρυικούς σάκους. Οι σάκοι έχουν την μορφή ροπαλοειδούς κάψουλας με διάφανο, λείο, σκληρό περίβλημα το οποίο δεν φέρει κάποιο επιφανειακό πόρο για την απελευθέρωση των νυμφών (Εικ. 37). Το μέγεθος των σάκων εμφάνισε μεγάλη διακύμανση με το βάρος τους να κυμαίνεται από 0.12 έως 0.61g και το μήκος τους από 9.64 έως 23.6mm. Κάθε σάκος περιείχε 401-2062 κιτρινόχρωμα αυγά βυθισμένα μέσα σε μία παχύρρευστη ζελατινώδη ουσία.

Η βιοχημική σύσταση των εμβρυικών σάκων των τριτώνων *Charonia seguenzae* και η ενέργεια που αντιστοιχεί στα θρεπτικά που περιέχουν παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 6. Οι σάκοι αποτελούνται από $85.98 \pm 0.6\%$ νερό, $3.16 \pm 0.16\%$ ανόργανες ενώσεις, $8.42 \pm 0.5\%$ πρωτεΐνες, $0.79 \pm 0.22\%$ ολικά λίπη και $1.65 \pm 0.83\%$ υδατάνθρακες. Η ενέργεια που περικλείεται σε 1g σάκων ανέρχεται στα 473.9 cal. Η θερμοκρασία δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά την βιοχημική σύσταση των εμβρυικών σάκων. Τα αποτελέσματα των t-test που πραγματοποιήθηκαν για κάθε συστατικό παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.



Εικ. 37: Εμβρυικός σάκος *Charonia seguenzae*. Η μπάρα αντιστοιχεί σε κλίμακα 1 mm.

Πίνακας 6: Μέση περιεκτικότητα (%) των εμβρυικών σάκων σε υγρασία, τέφρα, πρωτεΐνες, ολικά λίπη και υδατάνθρακες και η ενέργεια που αντιστοιχεί στα θρεπτικά (cal/g).

Συστατικά σάκων	Περιεκτικότητα %	Ενέργεια (cal/g)
Υγρασία	85.98 ± 0.6	
Τέφρα	3.16 ± 0,16	
Πρωτεΐνες	8.42 ± 0.5	336.8
Ολικά λίπη	0.79 ± 0.22	71
Υδατάνθρακες	1.65 ± 0.83	66.1
Σύνολο		473.9

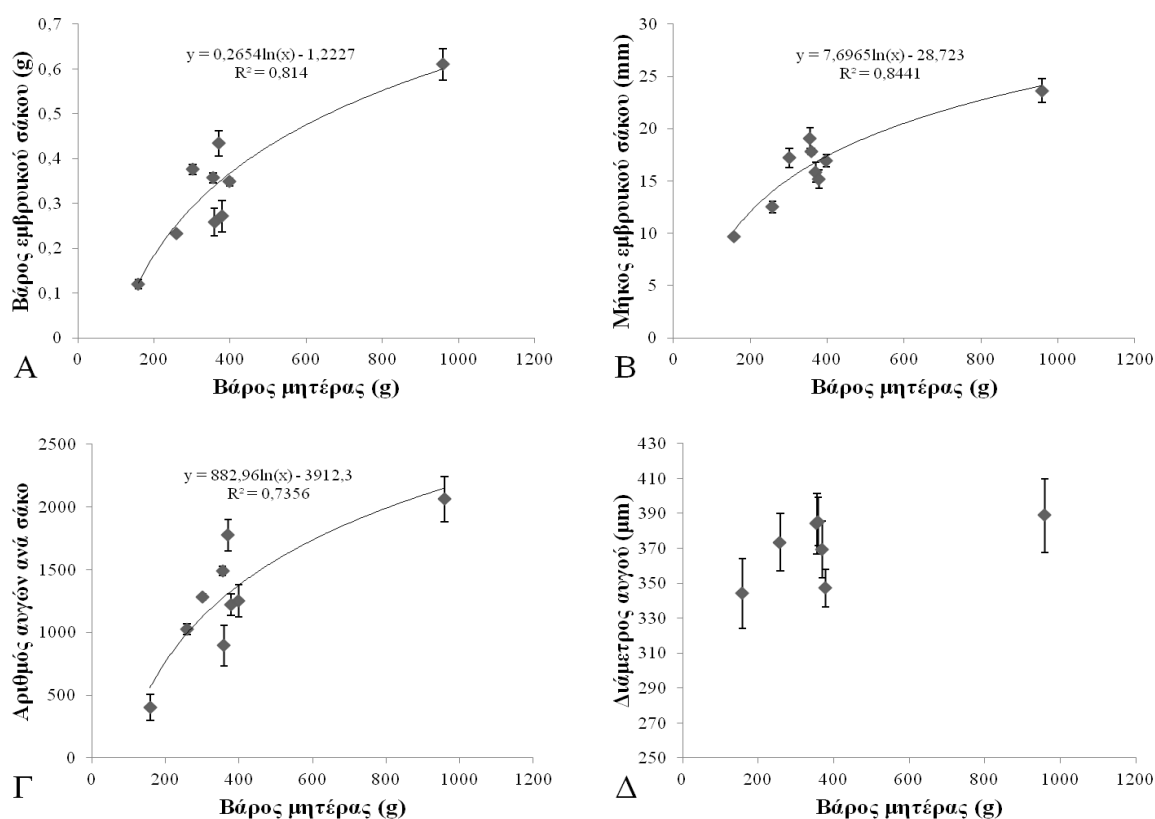
Πίνακας 7: Μέση περιεκτικότητα (%) των εμβρυικών σάκων σε υγρασία, τέφρα, πρωτεΐνες, ολικά λίπη και υδατάνθρακες σε δύο θερμοκρασιακές συνθήκες (20 °C και 23 °C).

Συστατικά σάκων	20 °C	23 °C	Στατιστική σύγκριση με t-test (p-value)
Υγρασία	86.03 ± 0.17	85.93 ± 0.84	0.598
Τέφρα	3.03 ± 0.09	3.26 ± 1.2	0.215
Πρωτεΐνες	8.23 ± 0.14	8.56 ± 0.66	0.459
Ολικά λίπη	0.93 ± 0.195	0,68 ± 0.2	0.519
Υδατάνθρακες	1.77 ± 0.32	1.56 ± 1.14	0.93

5.3.2. Επίδραση του μεγέθους της μητέρας στη γονιμότητα

Το βάρος των ενήλικων θηλυκών τριτώνων που εναπόθεσαν εμβρυικούς σάκους κυμάνθηκε από 158.66 έως 958.9g και το μήκος τους από 13,4 έως 25.6cm (Πίνακας 5). Το βάρος των σάκων αυξήθηκε λογαριθμικά σε σχέση με το βάρος της μητέρας και κυμάνθηκε μεταξύ $0.12 \pm 0.01g$ και 0.61 ± 0.04 για το μικρότερο και το μεγαλύτερο θηλυκό αντίστοιχα (Εικ. 38Α). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικές (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) με τα δύο μικρότερα άτομα να διαφέρουν από τα δύο μεγαλύτερα (Πίνακας 8). Το μήκος των σάκων αυξήθηκε

επίσης λογαριθμικά σε σχέση με το βάρος της μητέρας και κυμάνθηκε από 9.64 ± 0.18 έως 23.62 ± 1.14 mm (Εικ. 38B). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικές (1-way ANOVA, $p < 0.001$) με τα μικρότερα άτομα να διαφέρουν από τα μεγαλύτερα, αλλά και με σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα μεσαίου μεγέθους άτομα (Πίνακας 8) Αντίστοιχη ήταν και η αύξηση του αριθμού των αυγών που περιείχε κάθε σάκος, με τους μικρότερους να περιέχουν 402 ± 103 αυγά και τους μεγαλύτερους 2062 ± 182 αυγά (Εικ. 38Γ). Οι παρατηρούμενες διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) ακολουθώντας το ίδιο πρότυπο με τα μικρότερα άτομα να διαφέρουν σημαντικά από το μεγαλύτερο (Πίνακας 8). Το μέγεθος της μητέρας επηρέασε και το μέγεθος των αυγών με τη διάμετρο στο στάδιο του ενός κυττάρου να κυμαίνεται από 344 ± 20 έως 389 ± 21 μ m (Εικ. 38Δ) αν και δεν ακολουθήθηκε το ίδιο πρότυπο. Τα μικρότερα αυγά παρήχθησαν από το μικρότερο θηλυκό και τα μεγαλύτερα από το μεγαλύτερο. Όμως, τα αυγά ενός μεσαίου ατόμου (378.57 g) ήταν μικρότερα από αυγά μικρότερων ατόμων με τις παρατηρούμενες διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 8, 1-way ANOVA, $p < 0.001$).



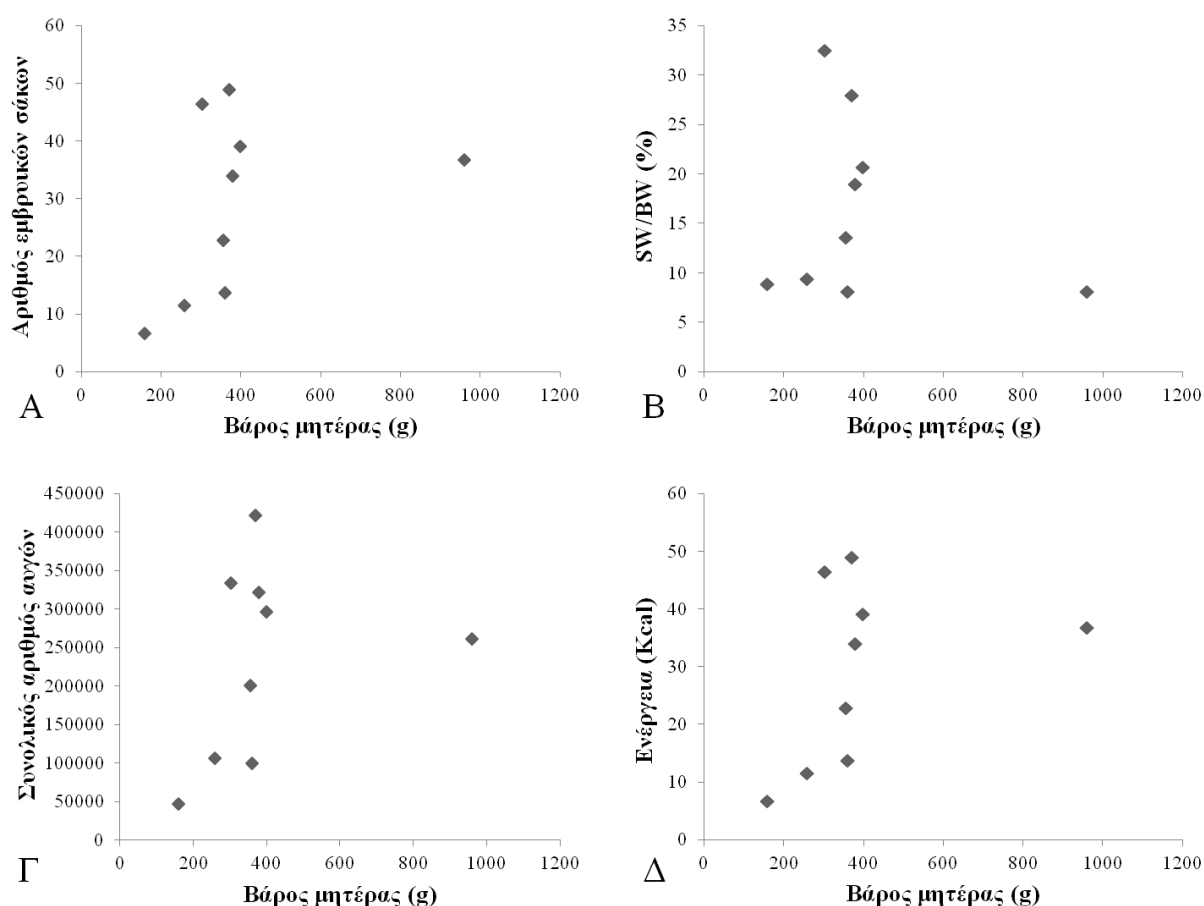
Εικ. 38: Επίδραση του μεγέθους της μητέρας Α) στο μέσο βάρος των εμβρυικών σάκων (\pm SD), Β) στο μέσο μήκος των εμβρυικών σάκων (\pm SD), Γ) στο μέσο αριθμό αυγών ανά σάκο (\pm SD) και Δ) στην μέση διάμετρο των αυγών στο στάδιο του ενός κυττάρου (\pm SD).

Πίνακας 8: Επίδραση του μεγέθους της μητέρας στο μέγεθος των εμβρυικών σάκων (βάρος, μήκος), στον αριθμό αυγών που περιέχουν και στην διάμετρο των αυγών στο στάδιο του ενός κυττάρου. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση (n=7 για βάρος, μήκος εμβρυικού σάκου και αριθμού αυγών, n=20 για την διάμετρο του αυγού). Οι τιμές που φέρουν διαφορετικό γραμματικό δείκτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p<0.05).

	B1 2013	C6 2011	C6 2014	C1 2013	D7 2011	D3 2010	E4 2011	B3 2014	D6 2010	Στατιστικός έλεγχος	p-value
Βάρος μητέρας (g)	158.6 ₆	258.4	302	355.4 ₈	359	370	378.5 ₇	398.7	958.9		
	0.12	0.23	0.38	0.36	0.26	0.43	0.27	0.35	0.61		
Βάρος εμβρυικού σάκου (g)	± 0.01	± 0.01	$\pm .01$	± 0.01	± 0.03	± 0.03	± 0.04	± 0.01	± 0.04	Kruskal- Wallis	<0.001
	a	a	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b	b	b		
Μήκος εμβρυικού σάκου (mm)	9.64	12.5	17.2	19.08	17.81	15.86	15.17	16.94	23.62		
	± 0.18	± 0.54	± 0.91	± 0.99	± 0.31	± 0.96	± 0.86	± 0.61	± 1.15	1-way ANOVA	<0.001
	a	b	c,d	d	c,d	c,e	e	c	f		
Αριθμός αυγών ανά σάκο	401	1026	1281	1491	895	1774	1221	1250	2062		
	± 103	± 44	± 23	± 35	± 161	± 124	± 88	± 127	± 182	Kruskal- Wallis	<0.001
	a	a	a,b	a,b	a	b	a,b	a,b	b		
Διάμετρος αυγού (μm)	344	373		384	385	369	347		389		
	± 20	± 16		± 17	± 14	± 16	± 11		± 21	1-way ANOVA	<0.001
	a	b,c,d		b,c,d	c	d	a		b,c		

Ο αριθμός των σάκων που εναποτέθηκαν ανά θηλυκό κυμάνθηκε από 104 έως 264 αλλά δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση με το μέγεθος (Εικ. 39Α). Τους λιγότερους και αντίστοιχα περισσότερους σάκους εναπόθεσαν άτομα των οποίων το βάρος διέφερε κατά 120g ενώ ο αριθμός των σάκων που εναπόθεσε το μεγαλύτερο και το μικρότερο άτομο διέφερε κατά 10 σάκους με τη διαφορά του σωματικού τους βάρους να φτάνει τα 800g. Αντίστοιχη διακύμανση παρατηρήθηκε και για το ποσοστό του συνολικού βάρους των σάκων επί του σωματικού βάρους της μητέρας που κυμάνθηκε από 8.08 έως 27.9% με τις χαμηλότερες τιμές να καταγράφονται για

ένα άτομο 359g και το μεγαλύτερο άτομο και τις υψηλότερες για ένα άτομο 370g (Εικ. 39B). Ο συνολικός αριθμός αυγών κάθε θηλυκού επηρεάστηκε από τον αριθμό των σάκων που εναπόθεσε και τον αριθμό των αυγών που περιείχε ο κάθε σάκος. Κυμάνθηκε από 46995 έως 422402 αυγά, με τα λιγότερα αυγά να αντιστοιχούν στο μικρότερο άτομο και τα περισσότερα στο άτομο που εναπόθεσε τους περισσότερους σάκους (Εικ. 39Γ). Ο συνολικός αριθμός αυγών που εναπόθεσε το μεγαλύτερο άτομο ανέρχεται στα 261899. Αντίστοιχο πρότυπο ακολούθησε και η κατανομή της ενέργειας που περικλείεται στο σύνολο των εμβρυικών σάκων του κάθε ατόμου που κυμάνθηκε από 6.65 έως 48.95Kcal με τη χαμηλότερη τιμή να αντιστοιχεί στο μικρότερο άτομο και τη μεγαλύτερη στο άτομο που εναπόθεσε τους περισσότερους εμβρυικούς σάκους (Εικ. 39Δ). Η ενέργεια που περικλείεται στους σάκους του μεγαλύτερου ατόμου ανέρχεται στα 36.71Kcal.



Εικ. 39: Επίδραση του μεγέθους της μητέρας Α) στον αριθμό εμβρυικών σάκων που εναπόθεσε κάθε άτομο Β) στο ποσοστό (%) του βάρους του συνόλου των σάκων επί του σωματικού βάρους του θηλυκού (SW/BW), Γ) στον συνολικό αριθμό αυγών που εναπόθεσε το κάθε θηλυκό άτομο και Δ) στην ενέργεια που περικλείεται στο σύνολο των εμβρυικών σάκων του κάθε θηλυκού ατόμου.

5.3.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στη γονιμότητα.

Το μέσο βάρος των θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν δεν διέφεραν σημαντικά (Mann – Whitney, $p=0.7$) στις δύο υπό εξέταση θερμοκρασίες (20 και 23 °C). Ο μέσος αριθμός εμβρυικών σάκων που εναποτέθηκαν ήταν ελαφρώς μικρότερος για τους 23 °C φθάνοντας τους 204.7 ± 81.3 σάκους έναντι 211 ± 66.9 στους 20 °C με τις παρατηρούμενες διαφορές να μην είναι στατιστικά σημαντικές (t-test, $p=0.922$). Το ίδιο πρότυπο παρατηρήθηκε και στα βιομετρικά χαρακτηριστικά των σάκων με το βάρος, το μήκος και τον αριθμό αυγών ανά σάκο να είναι ελαφρώς μικρότερα στους 23 °C σε σχέση με τους 20 °C και τις παρατηρούμενες διαφορές να μην είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 9). Η θερμοκρασία δεν επηρέασε ούτε τη διάμετρο των αυγών που κυμάνθηκε από $367.26 \pm 19.15\mu\text{m}$ στους 23°C έως $378.68 \pm 7.47\mu\text{m}$ στους 20°C με τις παρατηρούμενες διαφορές να μην είναι στατιστικά σημαντικές (t-test, $p= 0.878$). Ο συνολικός αριθμός αυγών ακολουθεί αντίστροφο πρότυπο με τα περισσότερα αυγά να καταγράφονται στους 23°C φθάνοντας τα 281661 ± 164926 ενώ στους 20°C τα 277326 ± 68567 χωρίς όμως να διαφέρουν σημαντικά (t-test, $p= 0.968$). Το βάρος των αυγών επί του σωματικού βάρους της μητέρας, SW/BW (%), και η συνολική ενέργεια που περιλαμβάνουν οι εμβρυικοί σάκοι αν και ήταν χαμηλότερη στους 23 από τους 20°C δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά (t-test, $p= 0.648$ και $p=0.768$ αντίστοιχα) μεταξύ τους.

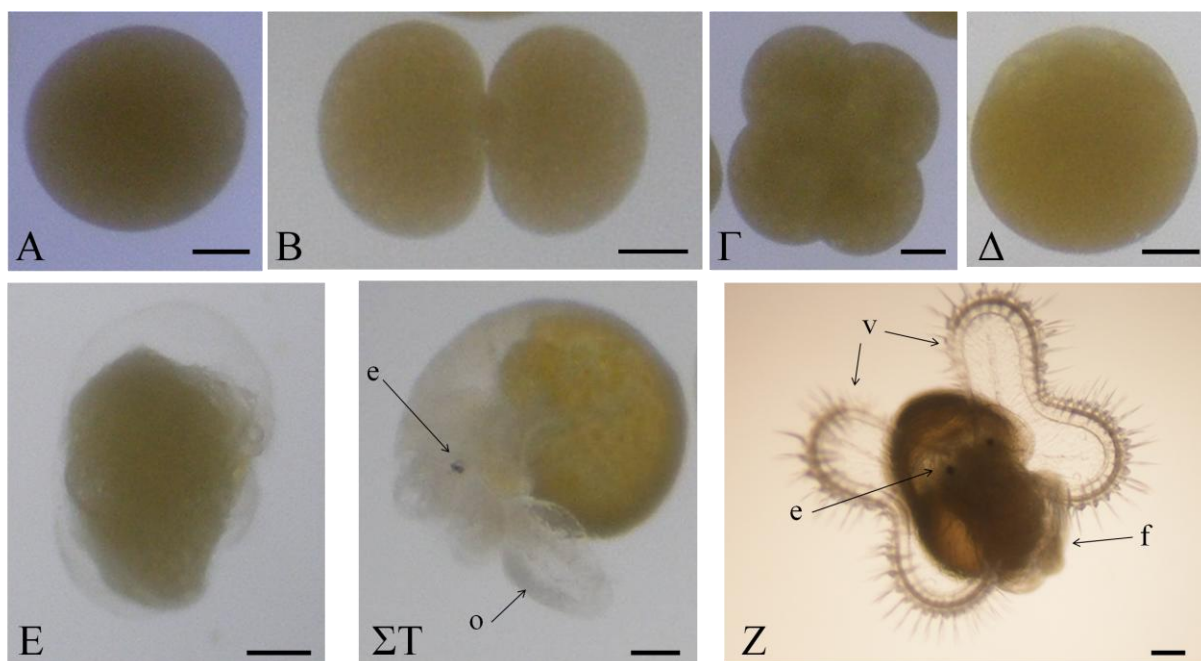
Πίνακας 9: Επίδραση της θερμοκρασίας (20 και 23°C) στον αριθμό και στο μέγεθος των εμβρυικών σάκων (βάρος, μήκος), στον αριθμό αυγών ανά εμβρυικό σάκο, στην διάμετρο των αυγών στο στάδιο του ενός κυττάρου, στο συνολικό αριθμό αυγών, στο ποσοστό του βάρους των αυγών επί του σωματικού βάρους της μητέρας, SW/BW (%), και στη συνολική ενέργεια που περιλαμβάνουν οι εμβρυικοί σάκοι. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση (n=3)

	20 °C	23 °C	Στατιστικός έλεγχος	p-value
Βάρος μητέρας (g)	352.06 \pm 48.44	369.19 \pm 9.81	Mann-Whitney	0.7
Αριθμός εμβρυικών σάκων	211 \pm 66.9	204,7 \pm 81.3	t-test	0.922
Βάρος εμβρυικού σάκου (g)	0.36 \pm 0.014	0,32 \pm 0.09	t-test	0.533
Μήκος εμβρυικού σάκου (mm)	17.74 \pm 1.17	16.27 \pm 1.37	t-test	0.232
Αριθμός αυγών ανά σάκο	1340.8 \pm 131.02	1296.8 \pm 445	t-test	0.878
Συνολικός αριθμός αυγών	277326 \pm 68567	281661 \pm 164926	t-test	0.968
SW/BW (%)	22.25 \pm 9.56	18.32 \pm 9.94	t-test	0.648
Συνολική ενέργεια που περιλαμβάνουν οι σάκοι (Kcal)	36.15 \pm 12.1	32.24 \pm 17.67	t-test	0.768

5.3.4. Εμβρυική ανάπτυξη

Όλα τα αυγά που περιέχονταν στους εμβρυικούς σάκους αναπτύχθηκαν σε έμβρυα και δεν παρατηρήθηκαν μη αναπτυσσόμενα αυγά που χρησιμεύουν στην θρέψη των αναπτυσσόμενων εμβρύων (nurse eggs). Τα αναπτυξιακά στάδια από το 1-κύτταρο έως το στάδιο της ελεύθερης πεπλοφόρας νύμφης απεικονίζονται στην εικόνα 40 και η σχέση τους με το χρόνο στους 23°C φαίνεται στον πίνακα 10. Η οντογένεση προχώρησε αργά με το στάδιο του μη διχοτομημένου κυττάρου να διαρκεί 1 ημέρα (Εικ. 40Α). Κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του *C. seguenzae* πραγματοποιήθηκε σπειροειδής αυλάκωση που στις 2 πρώτες διαιρέσεις οδήγησε στο σχηματισμό ίσων κυττάρων (Εικ. Β-Γ). Ο σχηματισμός του μοριδίου ολοκληρώθηκε 4 ημέρες μετά την εναπόθεση (HME) και το στάδιο του βλαστιδίου-γαστριδίου διήρκησε 9 ημέρες (Εικ. 40Δ). Οι τροχοφόρες νύμφες (Εικ. 40Ε) άρχισαν την κυκλική τους κίνηση μέσα στον εμβρυικό σάκο τη 13^η HME. Η μεταμόρφωση των τροχοφόρων νυμφών σε πεπλοφόρες νύμφες ξεκίνησε με τον σχηματισμό του κελύφους την 20^η HME και ολοκληρώθηκε 7 ημέρες αργότερα (26^η HME) με τον

πλήρη σχηματισμό του πρωτο-κελύφους (protoconch) (Εικ. 40ΣΤ) Καθ' όλη τη διάρκεια της μεταμόρφωσης από τροχοφόρο σε πεπλοφόρο νύμφη τα έμβρυα εμφάνιζαν ενεργή ακαθόριστη κίνηση μέσα στο σάκο. Οι νύμφες εκκολάφθηκαν από τους εμβρυικούς σάκους ως ελεύθερες πελαγικές πεπλοφόρες νύμφες σε 49 ΗΜΕ. Οι πεπλοφόρες νύμφες έφεραν ένα ανοιχτόχρωμο καφέ, ημιδιάφανο, δεξιόστροφο πρωτο-κέλυφος χωρίς ανάγλυφο (Εικ. 40ΣΤ). Ένα τροχοφόρο πέπλο χωρίς χρωματοφόρα με τέσσερις λοβούς και δύο μαύρες οφθαλμικές κηλίδες, με τον πόδα και το διαφανές επικαλυμματικό να είναι εύκολα ορατά (Εικ. 40ΣΤ-Z). Τα ελεύθερα πεπλοφόρα στάδια κολυμπούσαν στη στήλη του νερού και τρέφονταν με μονοκύτταρους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς και διάτομα (*Chlorella sp.*, *Tetracelmis sp.*, *Isochrysis sp.*, *Phaeodactylum sp.*). Διατηρήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες έως και 3 μήνες μετά την εκκόλαψη χωρίς να μεταμορφωθούν.



Εικ. 40: Αναπτυξιακά στάδια *Charonia seguenzae*: Α) στάδιο 1- κυττάρου, Β) στάδιο 2-κυττάρων, Γ) στάδιο 4-κυττάρων, Δ) Μορίδιο, Ε) τροχοφόρος νύμφη, ΣΤ) πεπλοφόρος νύμφη, Ζ) Ελεύθερη πελαγική πεπλοφόρος νύμφη. e: μάτι, f: πόδας, ο: επικαλυμματικό, v: πέπλο. Η μπάρα αντιστοιχεί σε κλίμακα 0.1mm.

5.3.5. Επίδραση της θερμοκρασίας στην εμβρυική ανάπτυξη

Η θερμοκρασία επηρέασε τόσο τη διάρκεια του κάθε σταδίου (Πίνακας 10) όσο και το μέγεθος του εμβρύου (Πίνακας 11, Εικ. 41). Η ανάπτυξη σε υψηλότερη

θερμοκρασία είχε μικρότερη διάρκεια και οδήγησε στην παραγωγή μικρότερων σε μέγεθος νυμφών. Τα έμβρυα χρειάστηκαν 9 ημέρες για να περάσουν από το στάδιο του μοριδίου σε αυτό της τροχοφόρου νύμφης στους 23°C, 13 ημέρες στους 20°C και 16 ημέρες στους 17°C. Αντίστοιχα χρειάστηκαν 10 ημέρες για την πλήρη μεταμόρφωση της τροχοφόρου νύμφης σε πεπλοφόρο στους 23°C, 14 ημέρες στους 20°C και 26 ημέρες στους 17°C. Η εκκόλαψη στους 23°C πραγματοποιήθηκε στις 49 HME, στους 66 HME στους 20°C και στις 73 HME στους 17°C. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο μέγεθος των εμβρύων ήταν στατιστικά σημαντική (ANOVA, $p < 0.001$) ήδη από το στάδιο της τροχοφόρου νύμφης με τα έμβρυα που αναπτύσσονταν στους 17 °C να υστερούν σε μέγεθος σε σχέση με τις άλλες δύο θερμοκρασίες (Εικ. 41). Όμως από τον πλήρη σχηματισμό της πεπλοφόρου νύμφης έως την εκκόλαψη τα έμβρυα που αναπτύχθηκαν στους 17 °C ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος από αυτά που αναπτύχθηκαν στους 20°C και 23 °C. Οι παρατηρούμενες διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές (ANOVA, $p < 0.001$) με τις πεπλοφόρες νύμφες να έχουν κέλυφος μήκους $803.2 \pm 31.4 \mu\text{m}$ και να διαφέρουν από τις νύμφες των 20 °C και 23 °C των οποίων το μήκος του κελύφους στην εκκόλαψη ήταν $698.1 \pm 20.9 \mu\text{m}$ και $698.1 \pm 20.9 \mu\text{m}$ αντίστοιχα (Tukeys test, $p < 0.05$).

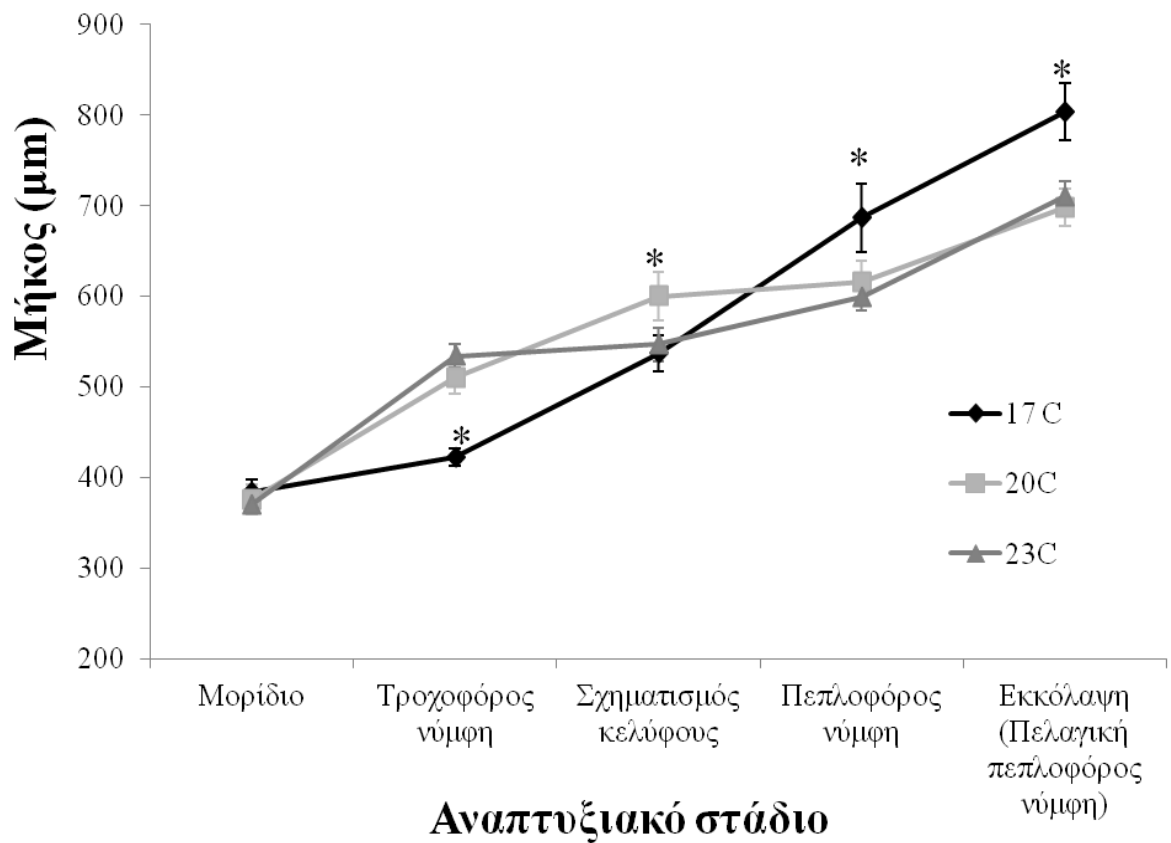
Η θερμοκρασία επηρέασε και την εμφάνιση παραμορφώσεων. Στους 17 °C, στο στάδιο της πεπλοφόρου νύμφης, καταγράφηκε πολύ υψηλό ποσοστό παραμορφώσεων, $94 \pm 4\%$, που διέφερε στατιστικά σημαντικά (ANOVA, $p < 0.001$) από τα αντίστοιχα ποσοστά στους 20 και 23°C που ανέρχονταν σε $4 \pm 0,7\%$ και $3 \pm 0,5\%$. Οι παραμορφωμένες πεπλοφόρες νύμφες ήταν μικρότερες σε μέγεθος, με υποπλασμένο κέλυφος και σώμα, υποπλασμένα πέπλα, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις είχε αποκολληθεί το σώμα από το κέλυφος (Εικ. 42).

Πίνακας 10: Αναπτυξιακά στάδια του *Charonia sequeenzae* σε σχέση με το χρόνο (Ημέρες μετά την εναπόθεση και διάρκεια σταδίου) και την θερμοκρασία (17, 20 και 23 °C).

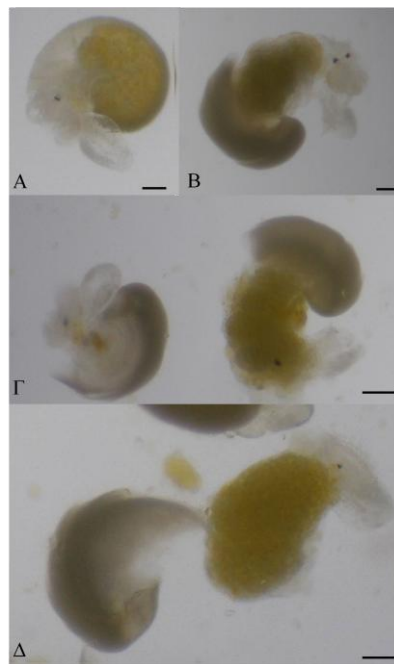
Αναπτυξιακό στάδιο	Ημέρες μετά την εναπόθεση (HME)			Διάρκεια σταδίου (Ημέρες)		
	17°C	20°C	23°C	17°C	20°C	23°C
1 κύτταρο			1			1
2 κύτταρα			2			1
4 κύτταρα			3			1
Μορίδιο			4	16	13	9
Τροχοφόρος νύμφη	20	17	13	17	9	7
Σχηματισμός κελύφους	37	26	20	9	5	3
Πεπλοφόρος νύμφη	46	31	26	27	35	23
Εκκόλαψη (Πελαγική πεπλοφόρος νύμφη)	73	66	49			

Πίνακας 11: Αναπτυξιακά στάδια του *Charonia sequeenzae* σε σχέση με τις διαστάσεις των εμβρύων (Ολικό μήκος-μήκος κελύφους) και την θερμοκρασία (17, 20 και 23 °C).

Αναπτυξιακό στάδιο	Μήκος (μm)		
	17 °C	20 °C	23 °C
Μορίδιο	383.6 ± 13.9	375.8 ± 16	370.2 ± 3.7
Τροχοφόρος νύμφη	422.4 ± 9.2 ^a	510 ± 18.1 ^b	534 ± 12.7 ^b
Σχηματισμός κελύφους	536.6 ± 20 ^a	599.8 ± 26.6 ^b	546.7 ± 18.8 ^a
Πεπλοφόρος νύμφη	686.8 ± 37.6 ^a	615.5 ± 24 ^b	599.3 ± 15.6 ^b
Εκκόλαψη (Πελαγική πεπλοφόρος νύμφη)	803.2 ± 31.4 ^a	698.1 ± 20.9 ^b	710.3 ± 16.7 ^b



Εικ. 41: Επίδραση της θερμοκρασίας (17, 20 και 23 °C) στο μήκος των εμβρύων του *Charonia seguenzae*. Οι τιμές αντιστοιχούν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, οι τιμές που φέρουν αστερίσκο (*) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) από τις υπόλοιπες για κάθε στάδιο.



Εικ. 42: Απεικόνιση φυσιολογικής (A) και παραμορφωμένων (B-Δ) πεπλοφόρων νυμφών του *Charonia seguenzae*. Η μπάρα αντιστοιχεί σε κλίμακα 0.1mm.

5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι τρίτωνες του είδους *Charonia seguenzae* τοποθετούν τα αυγά τους μέσα σε μία παχύρρευστη ζελατινώδη ουσία που περιβάλλεται από προστατευτική κάψουλα με λεπτό και σκληρό εξωτερικό τοίχωμα. Το σύνολο αποτελεί τον εμβρυικό σάκο που μοιάζει όσον αφορά στο σχήμα και την υφή με αυτούς που έχουν περιγραφεί για άλλα άτομα του γένους *Charonia* (Laxton, 1969, Zhang *et al.*, 2013) αλλά και της οικογένειας Ranelidae (Laxton, 1969, Canete *et al.*, 2012, Gallardo *et al.*, 2012). Οι εμβρυικοί σάκοι των Ranelidae, συμπεριλαμβανομένων αυτών του *C. seguenzae*, διαφέρουν, διότι έχουν λεπτά τοιχώματα χωρίς κάποιο επιφανειακό άνοιγμα σε αντίθεση με αυτούς των περισσότερων νεογαστερόποδων οι οποίοι έχουν χοντρά τοιχώματα που φέρουν ένα προ-διαμορφωμένο άνοιγμα για την απελευθέρωση των εμβρύων. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με την ασυνήθιστη γονική φροντίδα που παρατηρήθηκε, με τη μητέρα να παραμένει πάνω στους σάκους της μέχρι την εκκόλαψη. Με αυτόν τον τρόπο η μητρική φροντίδα αντισταθμίζει την ελλιπή ευρωστία των σάκων και η απελευθέρωση των νυμφών πιθανώς περιλαμβάνει τη λύση του άπω άκρου του σάκου (Laxton, 1969, παρούσα μελέτη).

Η έντονα διαφανής επιφάνεια των εμβρυικών σάκων, αν και απαντάται σπάνια ανάμεσα στα καινογαστρόποδα, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό ανάμεσα στα Ranelidae (Laxton, 1969, Canete *et al.*, 2012, Gallardo *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013). Η διαφάνεια των σάκων τους καθιστά δύσκολα αναγνωρίσιμους και πιθανώς να συντελεί στην αποφυγή οπτικών θηρευτών (Gallardo *et al.*, 2012). Εναλλακτικά, οι Gallardo *et al.*, πρότειναν ότι η διαφάνεια των σάκων βοηθάει στον συγχρονισμό των διαδικασιών της εκκόλαψης ενισχύοντας την μετάδοση του φωτός στα αναπτυσσόμενα έμβρυα, καθώς οι εμβρυικοί σάκοι εναποτίθενται σε βαθιά νερά .

Παρά τις ομοιότητες στην υφή και το σχήμα των εμβρυικών σάκων, παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις διαστάσεις των εμβρυικών σάκων ανάμεσα στα Ranelidae. Το μήκος των σάκων κυμάνθηκε από 3-14mm για τα *Cabestana spengleri* και *Monoplex australasiae* (Laxton, 1969), 9.6mm για το *Fusitriton magellanicus* (Canete *et al.*, 2012), 10.1-12.1mm για το *Argobuccinum pustulosum* (Gallardo *et al.*, 2012), 9-14mm για το *Charonia rubicunda* (Laxton, 1969), 9.6-23.6mm για το *C. seguenzae* (παρούσα μελέτη) και 33.9mm για το *Charonia tritonis* (Zhang *et al.*, 2013). Διαφορές όμως στο μέγεθος των εμβρυικών σάκων παρατηρήθηκαν και μέσα στο ίδιο είδος με τα μεγαλύτερα άτομα να εναποθέτουν

μεγαλύτερους σάκους (Canete *et al.*, 2012, Gallardo *et al.*, 2012, παρούσα μελέτη). Η επίδραση του μεγέθους της μητέρας στο μέγεθος των εμβρυικών σάκων δεν παρατηρείται μόνο στα μέλη της οικογένειας Ranellidae αλλά και σε άλλα γαστερόποδα (Spight & Emlen, 1976, Roberts & Hughes, 1980, Perron & Corpuz, 1982, Chararro *et al.*, 1999, Kingsley-Smith *et al.*, 2003, Chatzinikolaou & Richardson, 2010) και είναι απόρροια του περιορισμού του μεγέθους του σάκου από το μέγεθος του αδένου που τον εκκρίνει (capsule gland), το οποίο επηρεάζεται από το μέγεθος της μητέρας (Perron & Corpuz, 1982).

Αντίστοιχα, μεγάλη διακύμανση παρατηρήθηκε και στον αριθμό των αυγών ανά εμβρυικό σάκο τόσο ανάμεσα σε διαφορετικά είδη της ίδιας οικογένειας όσο και ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους με διαφορετικό μέγεθος. Οι εμβρυικοί σάκοι του *C. seguenzae* περιείχαν 401-2062 αναπτυσσόμενα έμβρυα, του *C. tritonis* 2046-2110 έμβρυα (Zhang *et al.*, 2013), του *F. magellanicus* 2439 (Canete *et al.*, 2012), και του *A. pustulosum* 2463-5356 έμβρυα (Gallardo *et al.*, 2012). Οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις στα *C. seguenzae* και *A. pustulosum* οφείλονται σε διαφορές στο μέγεθος των θηλυκών ατόμων. Ο αριθμός των εμβρύων ανά εμβρυικό σάκο αυξήθηκε με την αύξηση του σωματικού βάρους της μητέρας λόγω της αύξησης του μεγέθους του εμβρυικού σάκου (Gallardo *et al.*, 2012, παρούσα μελέτη). Μικρότερα σε μέγεθος άτομα της οικογένειας Ranellidae όπως τα *F. magellanicus* και *A. pustulosum* περιέκλειαν στους μικρότερους σάκους τους περισσότερα αυγά από τα *C. seguenzae* και *C. tritonis*. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στο μέγεθος των αυγών αφού η διάμετρός τους στα δύο πρώτα είδη είναι 168 και 180μm ενώ στα δύο *Charonia* σχεδόν διπλάσια φθάνοντας τα 344-389μm και 428μm αντίστοιχα.

Η αύξηση της γονιμότητας με την αύξηση του μεγέθους έχει αναφερθεί σε αρκετά γαστερόποδα (Spight & Emlen, 1976, Roberts & Hughes, 1980, Perron & Corpuz, 1982, Kingsley-Smith *et al.*, 2003, Chatzinikolaou & Richardson, 2010). Στην παρούσα μελέτη, το μέγεθος της μητέρας αν και επηρέασε άμεσα το μέγεθος των σάκων και τον αριθμό αυγών που περικλείουν, δεν επηρέασε με τον ίδιο τρόπο την γονιμότητα. Ο αριθμός σάκων ανά θηλυκό κυμάνθηκε από 104 έως 264, ο συνολικός αριθμός αυγών από 47 έως 422 χιλιάδες και το ποσοστό των εμβρυικών σάκων επί του σωματικού βάρους της μητέρας από 8.08 έως 27.9% με τις τιμές που παρατηρούνταν για παρόμοιου μεγέθους θηλυκά άτομα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Το φαινόμενο αυτό έχει καταγραφεί και σε άλλα γαστερόποδα με τα θηλυκά να τροποποιούν τα επίπεδα γονιμότητας ελέγχοντας τον αριθμό ή/και το

μέγεθος των εμβρυικών σάκων και των αυγών που περικλείονται σε κάθε σάκο (Castilla & Cancino 1976, Spight & Emlen 1976, Perron 1981, Perron & Corpuz 1982, Deslous-Paoli & Herald 1986). Έτσι, η μητέρα μπορεί να μεταβάλλει τα επίπεδα γονιμότητας, αλλά το μέγιστο επίπεδο να καθορίζεται από το μέγεθός της. Το ίδιο μοτίβο, με το μέγεθος της μητέρας να επηρεάζει τις διαστάσεις των σάκων και τον αριθμό των αυγών που περιέχουν αλλά όχι τον αριθμό των σάκων έχει παρατηρηθεί και στο *Crepidula dilatata* (Chararro *et al.*, 1999).

Σε αντίθεση με το μέγεθος της μητέρας, η θερμοκρασία δεν επηρέασε τη γονιμότητα και τους εμβρυικούς σάκους. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι δύο θερμοκρασιακές συνθήκες που εξετάστηκαν ανήκουν στο αναπαραγωγικό θερμοκρασιακό εύρος. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την μελέτη της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς (κεφάλαιο 5) απ' όπου προέκυψε ότι οι τρίτωνες αναπαράγονται στους 20 και 23 °C αλλά όχι στους 17 °C.

Το πρότυπο της ανάπτυξης του *C. seguenzae* μέσα στο σάκο είναι όμοιο με αυτό που ακολουθούν τα περισσότερα γαστερόποδα (Pechenik, 1986). Ειδικότερα, στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε ολοβλαστική σπειροειδής αυλάκωση κατά τις δύο πρώτες διαιρέσεις οδηγώντας στον σχηματισμό 2 και τεσσάρων ίσων κυττάρων αντίστοιχα. Το ίδιο πρότυπο καταγράφεται και για άλλα μέλη της οικογένειας Ranelidae όπως τα *C. tritonis* (Zhang *et al.*, 2013), *F. magellanicus* (Canete *et al.*, 2012) και *A. pustulosum* (Gallardo *et al.*, 2012) αλλά και άλλα προσοβράγχια όπως τα *Bursa corrugata* (D'Asaro, 1969) και *Crepidula fornicata* (Henry *et al.*, 2006). Μετά το στάδιο του μοριδίου, ακολουθούν τα στάδια της τροχοφόρου και πεπλοφόρου νύμφης, κοινά σε όλα τα Ranellidae (Canete *et al.*, 2012, Gallardo *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013).

Η χρονική διάρκεια της ανάπτυξης των εμβρύων μέσα στους σάκους ποικίλει ανάμεσα στα Ranellidae. Οι Gallardo *et al.* (2012) χώρισαν τα μέλη της οικογένειας Ranellidae σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την ταχύτητα ανάπτυξης, η οποία με τη σειρά της φέρεται να εξαρτάται από το γεωγραφικό πλάτος και την θερμοκρασία. Στα τροπικά νερά η διάρκεια της ανάπτυξης στα διάφορα είδη του γένους *Cymatium* (Govan, 1995) αλλά και το *Cabestana corrugatum* (Ramon, 1991) κυμαίνεται μεταξύ 10 και 22 ημερών, ενώ στα ζεστά εύκρατα νερά είδη όπως τα *Cabestana cutacea* (Ramon, 1991), *Charonia lampas* (Cazaux, 1972) και *Priene scabrum* (Romero *et al.*, 2003) εκκολάπτονται 27-38 ημέρες μετά την εναπόθεση. Τέλος στα κρύα εύκρατα νερά η ανάπτυξη είναι πιο αργή με τους σάκους των *F. oregonensis* (Strathmann &

Strathmann, 2007), *F. magellanicus* (Canete *et al.*, 2012) και *A. pustulosum* (Gallardo *et al.*, 2012) να εκκολάπτονται 50 με 67 ημέρες μετά την εναπόθεση. Εξαιρέση σε αυτήν την κατάταξη φαίνεται να αποτελούν τα *C. seguenzae* (παρούσα μελέτη) και *C. tritonis* (Zhang *et al.*, 2013) που, παρά το ότι αναπτύχθηκαν σε θερμά εύκρατα νερά, η διάρκεια της ανάπτυξης τους κυμάνθηκε από 49 μέχρι 59 ημέρες στους 23 και 24 °C αντίστοιχα.

Παρά τη μεγάλη διάρκεια ανάπτυξης μέσα στον εμβρυικό σάκο που εμφάνισε το *C. seguenzae* στους 23 °C, η μείωση της θερμοκρασίας επιβράδυνε περαιτέρω την ανάπτυξη με την εκκόλαψη στους 20 και 17 °C να λαμβάνει χώρα 66 και 73 ημέρες αντίστοιχα μετά την εναπόθεση. Αύξηση της διάρκειας της εμβρυικής ανάπτυξης με την αύξηση της θερμοκρασίας έχει παρατηρηθεί και σε άλλα θαλάσσια γαστερόποδα (Scheltema, 1967, Roller & Stickle, 1989, Przeslawski, 2004) και γενικότερα σε θαλάσσιους οργανισμούς (ανασκόπηση για ψάρια, Pauly & Pullin, 1988). Αντίστοιχα η θερμοκρασία επηρέασε και το μέγεθος των εμβρύων σύμφωνα με τον κανόνα θερμοκρασίας μεγέθους που απαντά στην πλειονότητα των θαλάσσιων εξώθερμων οργανισμών (Atkinson, 1994, Atkinson & Sibly, 1997). Οι εκκολαπτόμενες πεπλοφόρες νύμφες που αναπτύχθηκαν στους 17 °C ήταν μεγαλύτερες από αυτές που αναπτύχθηκαν στους 20 και 23 °C.

Εκτός από την χρονική υστέρηση στην εκκόλαψη των σάκων και την αύξηση στο μέγεθος των ελεύθερων πεπλοφόρων νυμφών, η μείωση της θερμοκρασίας στους 17°C οδήγησε στην εμφάνιση μεγάλου ποσοστού παραμορφωμένων νυμφών. Οι παράγοντες που ευθύνονται για την εμφάνιση παραμορφώσεων κατά την εμβρυική ανάπτυξη των γαστεροπόδων είναι ελάχιστα μελετημένοι. Οι υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές αφορούν στην επίδραση της υπερϊόδους ακτινοβολίας (Biermann *et al.*, 1992, Rawlings, 1996, Carefoot *et al.*, 1998), στην οξίνιση των ωκεανών (Crim *et al.*, 2011, Noisette *et al.*, 2014, Onitsuka *et al.*, 2014) και τη συνδυασμένη επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας και της οξίνισης των ωκεανών (Melatunan *et al.*, 2013) στην εμφάνιση παραμορφώσεων κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Τα έμβρυα στρεσάρονται και συχνά πεθαίνουν αν εκτεθούν σε ακραίες - σε σχέση με τις φυσικές περιβαλλοντικές τους - θερμοκρασίες (Przeslawski, 2004). Αν και υπάρχει ένα ανώτατο κι ένα κατώτατο όριο ανθεκτικότητας, κάποια έμβρυα έχουν την ικανότητα να προστατεύονται έναντι των πολύ υψηλών θερμοκρασιών ως ένα βαθμό. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη heat-shock πρωτεϊνών μέσα στους εμβρυικούς σάκους που επιτρέπουν στα έμβρυα να

ανταπεξέρχονται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (Podolsky & Hoffmann, 1998). Ερωτήματα εγείρονται σχετικά με το λόγο της εμφάνισης τόσο υψηλών ποσοστών παραμορφωμένων ατόμων στους 17°C, θερμοκρασία που επικρατεί στο φυσικό περιβάλλον στις αρχές του χειμώνα (Poulos *et al.*, 1997) και υπολογίζεται ότι εκκολάπτονται οι σάκοι. Το μεγάλο ποσοστό παραμορφώσεων που παρατηρήθηκε στους 17°C μπορεί να οφείλεται στην χρονική περίοδο που εφαρμόστηκε η χαμηλή θερμοκρασία. Μελέτες σε άλλα γαστερόποδα έχουν δείξει ότι τα έμβρυα είναι πιο ευαίσθητα κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια ενώ αναπτύσσουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις περιβαλλοντικές αλλαγές καθώς ωριμάζουν (Biermann *et al.*, 1992, Podolsky & Hoffmann, 1998, Przeslawski, 2004). Αντίστοιχες μελέτες σε ψάρια έχουν δείξει ότι η επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών σε διαφορετικά χρονικά παράθυρα στην ανάπτυξη των ψαριών μπορούν να επηρεάσουν την αναλογία φύλου (Koumoundouros *et al.*, 2002) και την εμφάνιση παραμορφώσεων (Georgakopoulou *et al.*, 2010). Μία άλλη λιγότερο πιθανή εξήγηση είναι η μεγάλη θερμοκρασιακή διαφορά (6°C) και η ταχύτητα εγκλιματισμού (24h). Από προσωπικά δεδομένα που δεν αναφέρονται στην παρούσα μελέτη, ο εγκλιματισμός σάκων που γεννήθηκαν στους 20°C στους 17°C οδήγησε σε αντίστοιχα ποσοστά παραμορφωμένων.

Η ανάπτυξη ήταν έμμεση οδηγώντας στην εκκόλαψη πελαγικών πεπλοφόρων νυμφών, ακολουθώντας το πρότυπο των υπόλοιπων μελετημένων ειδών της οικογένειας Ranellidae (Laxton, 1969, Scheltema, 1971a,b, Canete *et al.*, 2012, Gallardo *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013). Κάποια χαρακτηριστικά των σταδίων ανάπτυξης αλλά κυρίως της εκκολαπτόμενης νύμφης, όπως το χαρακτηριστικό τετράλοβο πέπλο, παραπέμπουν στην μεγάλης διάρκειας πλαγκτονική ζωή (Strathmann & Strathmann, 2007, Canete *et al.*, 2012, Gallardo *et al.*, 2012). Η μακρόχρονη πελαγική διαβίωση που παρατηρήθηκε για το *C. seguenzae* είναι σύμφωνη με τις αναφορές που υπάρχουν για τα υπόλοιπα Ranellidae των οποίων η πελαγική διαβίωση διαρκεί από 5-10 μήνες (Scheltema, 1971a,b) έως και 4.5 χρόνια (Strathmann & Strathmann, 2007). Δεδομένης της ύπαρξης αυτού του μεγάλου πλαγκτονικού σταδίου σε συνδυασμό με τη στατική αύξηση και την περιορισμένη ασβεστοποίηση του κελύφους που παρατηρήθηκε στο *Cymatium parthenoreum* κατά την υπερατλαντική μεταφορά του (Pechenik, 1984), είναι πολύ πιθανό ένα παρατεταμένο πελαγικό στάδιο να αποτελεί μια οικολογική στρατηγική για την υπερωκεάνια διασπορά αυτών των βενθικών σαρκοφάγων γαστερόποδων. Η μεγάλη

ικανότητα διασποράς σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό νυμφών που παράγονται ανά γέννα, ο οποίος κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες χιλιάδες έως μερικά εκατομμύρια (Galliaro *et al.*, 2012) ανάμεσα στα Ranellidae, έχουν σαν αποτέλεσμα την ευρεία γεωγραφική εξάπλωση των μελών της οικογένειας (Beu, 2010).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνεισφέρουν στην κατανόηση της βιολογίας και της οικολογίας του είδους και ανοίγουν νέα πεδία έρευνας. Από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των δύο τελευταίων ενοτήτων προκύπτει ότι οι τρίτωνες *Charonia seguenzae* επενδύουν στην παραγωγή πολλών απογόνων, παρέχοντάς τους προστασία τοποθετώντας τα έμβρυα σε προστατευτικούς σάκους τους οποίους συνεχίζουν να προστατεύουν και να περιποιούνται. Ταυτόχρονα, όντας μεγάλα σαρκοβόρα γαστερόποδα εξασφαλίζουν την ευρεία εξάπλωση των απογόνων τους με την ύπαρξη μιας μακροχρόνιας πελαγικής προνύμφης. Προέκυψαν επίσης δεδομένα που συσχετίζουν το μέγεθος της μητέρας και τη θερμοκρασία με θέματα που άπτονται της αναπαραγωγικής ικανότητας και της ανάπτυξης των εμβρύων. Η επιτυχής εκτροφή των πεπλοφόρων νυμφών και η επίτευξη της μεταμόρφωσης αποτελεί κύριο μελλοντικό στόχο, καθώς και η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των συνθηκών διαβίωσης της μητέρας (διατροφή, θερμοκρασία, κ.α.) στη γονιμότητα και της θερμοκρασίας σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στην ανάπτυξη των εμβρύων.

6. Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια μελέτης του προστατευόμενου θαλάσσιου γαστερόποδου *Charonia sequezea*. Το φυσικό αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν ο προσδιορισμός των βιολογικών απαιτήσεων του τρίωνα *Charonia sequezea* (Aradas & Benoit, 1870) προκειμένου να επιτευχθεί η συντήρηση υπό συνθήκες «ευζωίας» (welfare) ενηλίκων ατόμων και η αναπαραγωγή. Οι επιστημονικοί στόχοι ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις ενότητες που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα του κύκλου ζωής των τριτώνων παρέχοντας πληροφορίες που αφορούν στην βιολογία και οικολογία του είδους.

Η πρώτη ενότητα ασχολήθηκε με τον προσδιορισμό των διατροφικών απαιτήσεων (ποσοτικών και ποιοτικών), της προτίμησης και της συμπεριφοράς διατροφής των τριτώνων υπό τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (17, 20, 23°C). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τρίωνες κατανάλωσαν όλες τις τροφές που τους χορηγήθηκαν εμφανίζοντας πολύ υψηλό βαθμό διατροφικής «ευελιξίας» και προσαρμοστικότητας, η οποία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό ανάμεσα στα γαστερόποδα, με τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία να προσαρμόζονται στις αλλαγές του περιβάλλοντος (Elliott & Susswein, 2002). Αν και κατανάλωσαν όλες τις τροφές που τους χορηγήθηκαν, υπήρξε έκδηλη προτίμηση για ολοθούρια τα οποία όμως δεν αποτελούν την τροφή με την οποία τρέφονται αποκλειστικά οι τρίωνες αλλά προτιμούν να τρέφονται με ποικιλία τροφών. Η παροχή ποικιλίας τροφών, και συνεπώς η δυνατότητα εκδήλωσης προτίμησης, που είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ευζωία (welfare) των ζώων (Swaissgood, 2007), φαίνεται πως σχετίζεται άμεσα με την δυνατότητα των τριτώνων να συμπληρώνουν τη διατροφή τους με απαραίτητα για αυτά θρεπτικά στοιχεία. Όσον αφορά στις ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις των τριτώνων, η ημερήσια κατανάλωση τροφής των τριτώνων, *Charonia sequezea*, κυμάνθηκε μεταξύ 0.32 με 3.67% του βάρους τους, και εξαρτήθηκε από το είδος τροφής και την θερμοκρασία. Τα ολοθούρια ήταν η τροφή με τους καλύτερους διατροφικούς δείκτες και οι 23°C η βέλτιστη θερμοκρασία. Παρά την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων τροφής, παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός αύξησης των ενηλίκων τριτώνων ήταν ιδιαίτερα χαμηλός. Περαιτέρω μελέτες που σχετίζονται με την

δημιουργία και τη δοκιμή συνθετικών τροφών που θα στηρίζονται τόσο σε φυσικά θηράματα (εχινόδερμα) όσο και πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία παραγωγής ιχθυοτροφών, καθώς και με τις ποσοτικές απαιτήσεις σε μικρότερα άτομα θα συνέβαλαν στην επιτυχημένη εκτροφή ενήλικων ατόμων.

Στην δεύτερη ενότητα μελετήθηκε η συμπεριφορά θήρευσης των τριτώνων και η ημερονύκτια δραστηριότητά τους. Η συμπεριφορά των ζώων και η συμπεριφορική οικολογία συνδέονται άμεσα με την βιολογία διατήρησης απειλούμενων ειδών. Οι τρίτωνες εμφάνισαν το πρότυπο της ενεργής θήρευσης, όμοιο με αυτό που ακολουθούν πολλά σαρκοφάγα γαστερόποδα (Laxton, 1971, Kang & Kim, 2004, Morton, 2012). Κατά τη διάρκεια της θήρευσης οι τρίτωνες αυξάνουν την ταχύτητα με την οποία κινούνται, η οποία είναι υπερδιπλάσια της ταχύτητας του θηράματος (ολοθύριο). Όσον αφορά στην ημερονύκτια δραστηριότητα των τριτώνων, επηρεάστηκε από την πλήρωση του στομάχου με τα νηστικά άτομα να είναι πιο δραστήρια από αυτά που βρίσκονται στη χώνευση. Ένας άλλος παράγοντας που επηρέασε την ημερονύκτια δραστηριότητα ήταν το φως με τους τρίτωνες να είναι πιο δραστήριοι κατά τη διάρκεια της μέρας, σε αντίθεση με άλλα άτομα του ίδιου γένους που θεωρούνται νυχτόβιοι θηρευτές (Laxton, 1971). Η γνώση του προτύπου θήρευσης και η αλληλεπίδρασή του με την ημερονύκτια συμπεριφορά του *C. seguenzae* θα βοηθήσει στον σχεδιασμό στρατηγικών παρακολούθησης και τεχνικών απογραφής του πληθυσμού, ειδικά σε περιοχές όπου τα φυσικά αποθέματα είναι πολύ περιορισμένα, όπως ο μεγάλος κοραλλιογενής ύφαλος (). Περαιτέρω μελέτης χρήζει η εκδήλωση ανταγωνισμού για την τροφή που παρατηρήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, καθώς και η αποτελεσματικότητα των τριτώνων στην θήρευση αστεριών, ειδικότερα το κοραλλιοφάγου αστερία *Acanthaster planci*, μεμονωμένα, ή σε ομάδες.

Η τρίτη ενότητα αφορά στην αναπαραγωγή των τριτώνων. και παρέχει σημαντικές πληροφορίες που αφορούν στην βιολογία, συμπεριφορά και οικολογία τους, όπως το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο αναπαράγονται και η εκδήλωση γονικής φροντίδας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν δύο πτυχές της βιολογίας τους, η πολυανδρία που εμφανίζουν τα θηλυκά άτομα, και η εκδήλωση συνεργατικής φροντίδας των εμβρυικών σάκων που θέτει νέα ερωτήματα τόσο σε οικολογικό, όσο και εξελικτικό επίπεδο. Μελλοντικό στόχο αποτελεί η πραγματοποίηση γενετικών αναλύσεων που θα αφορούν στην πατρότητα των απογόνων καθώς και στην γενετική σύνθεση και τον βαθμό συγγένειας των ατόμων του πληθυσμού Τα αποτελέσματα

μπορούν να βοηθήσουν τόσο στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των φυσικών πληθυσμών με στόχο την οικολογική αποκατάσταση τους όσο και στην εκτροφή του είδους σε συνθήκες αιχμαλωσίας.

Η τέταρτη ενότητα αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας και του μεγέθους της μητέρας στην γονιμότητα και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Το μέγεθος της μητέρας αν και σχετίστηκε άμεσα με τις διαστάσεις των σάκων δεν επηρέασε με τον ίδιο τρόπο τη γονιμότητα. Η θερμοκρασία αν και δεν επηρέασε τη γονιμότητα, έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των εμβρύων, τόσο όσον αφορά στην ταχύτητα της ανάπτυξης και το μέγεθος των εμβρύων όσο και στην ανάπτυξη παραμορφώσεων. Από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των δύο τελευταίων ενοτήτων προκύπτει ότι οι τρίτωνες επενδύουν στην παραγωγή πολλών απογόνων, παρέχοντάς τους προστασία τοποθετώντας τα έμβρυα σε προστατευτικούς σάκους τους οποίους συνεχίζουν να προστατεύουν και να περιποιούνται. Ταυτόχρονα, εξασφαλίζουν την ευρεία εξάπλωση των απογόνων τους με την ύπαρξη μιας μακροχρόνιας πελαγικής προνύμφης. Η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των συνθηκών διαβίωσης της μητέρας (διατροφή, θερμοκρασία, κ.α.) στη γονιμότητα και της θερμοκρασίας σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στην επιβίωση και μορφολογία των εμβρύων.

Η θερμοκρασία επηρέασε όλα τα μελετημένα στάδια της ζωής των τριτώνων. Οι 20 με 23°C αποτελούν το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος όσον αφορά τη διατροφή, την αναπαραγωγή και την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αντίθετα η διαβίωση στους 17°C αποδείχθηκε προβληματική όσον αφορά τη διατροφή, ενώ δεν αποτελεί μέρος του θερμοκρασιακού εύρους στο οποίο αναπαράγονται οι τρίτωνες και οδηγεί στην εμφάνιση μεγάλου ποσοστού παραμορφώσεων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (όταν εφαρμόστηκε σε πρώιμο στάδιο της οντογένεσης). Πρόκειται λοιπόν για ένα είδος που προτιμά τα εύκρατα-ζεστά νερά. Η θερμοκρασία φαίνεται ότι αποτελεί φραγμό για την εξάπλωση του είδους στη Μεσόγειο καθώς τα νερά της Δυτικής Μεσογείου είναι πιο κρύα. Πιθανώς η αύξηση της θερμοκρασίας στη Μεσόγειο λόγω της κλιματικής αλλαγής να οδηγήσει στην επέκταση της εξάπλωσης των τριτώνων δυτικότερα, αλλά θα πρέπει να μελετηθεί η επίδραση υψηλότερων θερμοκρασιών (25-30°C) στους βιολογικούς δείκτες του είδους καθώς δεν είναι γνωστό το ανώτερο θερμοκρασιακό τους όριο.

Οι δοκιμές εκτροφής πεπλοφόρων νυμφών που επιχειρήθηκαν δεν οδήγησαν στην μεταμόρφωση των πεπλοφόρων νυμφών σε νεαρά άτομα. Όλες οι νύμφες πέθαιναν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα (έως 3 μήνες) από βακτηριακές

μολύνσεις. Η επιτυχής εκτροφή των πεπλοφόρων νυμφών και η επίτευξη της μεταμόρφωσης αποτελεί τον κυριότερο μελλοντικό στόχο. Για να επιτευχθεί είναι απαραίτητο να δοκιμαστούν διαφορετικά πρωτόκολλα διατροφής σε συνδυασμό με τη χορήγηση κατάλληλων αντιβιοτικών. Σημαντικό βήμα για την επίτευξη αυτού του στόχου αποτελεί και η εύρεση του παράγοντα που προκαλεί την μεταμόρφωση των νυμφών σε νεαρά άτομα και εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία ανάλογα με το είδος (θερμικό σοκ, σοκ αλατότητας, κατάλληλο υπόστρωμα, καθοδικά ρεύματα κ.α.) ή εναλλακτικά τη χρήση νευροδιαβιβαστών (KCl, GABA κ.α.) που προκαλούν εγκατάσταση.

7. Βιβλιογραφία

- Abdullahi, B. A., 1990. The effect of temperature on reproduction in three species of cyclopoid copepods. *Hydrobiologia* 196, 101-109.
- Aiken, D. E., Waddy, S. L., 1989. Interaction of temperature and photoperiod in the regulation of spawning by American lobsters (*Homarus americanus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46, 145-148.
- Akesson, T. R., 1977. The effect of temperature changes on the development of *Urechis caupo* Fisher and MacGintie 1928 (Echiuroidea). *Est. Coastal Mar. Sci.* 5, 445-453.
- Al-Habbib, O. A. M., Grainger, J. N. R., 1981. The effect of changing temperatures on the development of the eggs of *Lymnea peregra*. *J. Therm. Biol.* 6, 35-36.
- Al-Habbib, W. M. S., Grainger, J. N. R., 1983. Effect of constant and changing temperature on the rate of development of the eggs and the larval stages of *Fasciola hepatica*. *Proc. Royal Irish Acad. Sect. B. Biol. Geol. Chem. Sci.* 83, 281-290.
- Al-Tikrity, M. R., Grainger, J. N. R., 1990. The effect of temperature and other factors on the hatching of the resting eggs of *Tanymastix stagnalis* L. (Crustacea, Anostraca). *J. Therm. Biol.* 15, 87-90.
- Allee, W. C., 1923a. Studies in marine ecology. III. Some physical factors related to the distribution of littoral invertebrates. *Biol. Bull.* 44, 205-253.
- Allee, W. C., 1923b. Studies in marine ecology. IV. The effect of temperature in limiting the geographical range of invertebrates of the Woods Hole littoral. *Ecology* 4, 341-354.
- Almada-Villela, P.C., Davenport, J., Gruffydd, L.D., 1982. The effects of temperature on the shell growth of young *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 59, 275-288.
- Amio, M., 1974. A comparative embryology of marine gastropods, with ecological considerations. *J. Shimonoseki Univ. Fish.* 12, 229-358.

- Anderson, D.T., 1959. The reproduction and early life history of the gastropod *Cymatillesta spengleri* (Perry) (Fam: Cymatiidae). Proc. Linnaen Soc. New South Wales 84, 232-237.
- Anger, K., 1983. Temperature and the larval development of *Hyas araneus* L. (Decapoda, Majidae): extrapolation of laboratory data to field conditions. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 69, 203-215.
- Anger, K., 1991. Effects of temperature and salinity on the larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae). Mar. Ecol. Prog. Ser. 72, 103-110.
- Ankel, W.E., 1936. Prosobranchia, Die Tierwelt der Nord- und Ostsee.
- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Aranda, A.D., Lucas, A., Brule, T., Salguero, E., Rendoni, F., 1989. Effects of temperature, algal food, feeding rate and density on the larval growth of the milk conch (*Strombus costatus*) in Mexico. Aquaculture 76, 361-371.
- Árnason, T., Björnsson, B., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., 2009. Effects of temperature and body weight on growth rate and feed conversion ratio in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 295, 218–225.
- Athema, J., 1980. Chemical senses, chemical signals, and feeding behavior in fishes. In Bardach, J.E., J.J. Magnuson, R.C. May and J.M. Reinhart (eds.) Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes. ICLARM Conference Proceedings 5, 512p. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. 57-101.
- Atkinson, D., 1994. Temperature and organism size - A biological law for ectotherms? ADV.ECOL.RES. 25, 1-58.
- Atkinson, D., Sibly, R.M., 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. Trends Ecol. Evol. 12, 235–239.
- AZA, 1996. Cichlids 96 Report. <http://www.aza.org/programs/ssp/ssp.cfm>. 1 Jan 1996.

- Bailey, D.F., Laverack, M.S., 1966. Aspects of the neurophysiology of *Buccinum undatum* L. (Gastropoda). I. Central responses to stimulation of the osphradium. *J. Exp. Biol.* 44, 131–148.
- Bandel, K., Riedel, F., Tiemann, H., 1994. A special adaptation to planktonic life in larvae of the Cassoidea (=Tonnoidea) (Gastropoda). *Mar. Biol.* 118, 101–108.
- Barnes, H., Barnes, M., 1975. The general biology of *Verruca stroemia*, 5. Effect of feeding, temperature and light regime on breeding and molting cycles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 19, 227-232.
- Bayne, B.L. 1976. *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Bayne, B., Scullard, C. 1978. Rates of feeding by *Thais (Nucella) lapillus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 32, 113–129
- Beaumont, A.R., Budd, M.D., 1982. Delayed growth of mussel (*Mytilus edulis*) and scallop (*Pecten maximus*) veligers at low temperatures. *Mar. Biol.* 71, 97-100.
- Beddingfield, S.D., McClintock, J.B., 1993. Feeding behavior of the sea star *Astropecten articulatus* (Echinodermata: Asteroidea): an evaluation of energy-efficient foraging in a soft-bottom predator. *Mar. Biol.* 115, 669–676.
- Bence, J.R., Murdoch, W.W., 1986. Prey size selection by the mosquitofish: relation to optimal diet theory. *Ecology* 67, 324-336.
- Berg CJ. 1971. Egg capsule and early veliger of *Charonia tritonis* (Linnaeus). *Veliger*. 13, 298.
- Bergmüller, R., Johnstone, R.A., Russell, A.F., Bshary, R., 2007. Integrating cooperative breeding into theoretical concepts of cooperation. *Behav. Processes* 76, 61–72.
- Bernardi, N., 1990. Temperature influence upon food ingestion and spontaneous locomotion of the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann 1836 (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *J. Therm. Biol.* 15, 33-36.

- Beu, A.G., 1970. The mollusc of the genus *Charonia* (Family Cymatiidae). Trans. R. Soc. NZ. Biol. Ser. 11, 205-223.
- Beu, A.G., 2010. Neogene tonnoidean gastropods of tropical and south America: Contributions to the dominican republic and Panama paleontology projects and UPLIFT of the central American isthmus. Bull. Am. Paleontol. 2010, 1–499.
- Bhaud, M., 1988. Influence of temperature and food supply on development of *Eupolymnia nebulosa* (Montagu 1818) (Polychaeta, Terebellidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 118, 103-113.
- Biermann, C.H., Schinner, G.O., Strathmann, R.R., 1992. Influence of solar radiation, microalgal fouling, and current on deposition site and survival of embryos of a dorid nudibranch gastropod. Mar. Ecol. Prog. Ser. 86, 205-215.
- Birkeland, C., Lucas, J.S., 1990. *Acanthaster planci*: major management problem of coral reefs. CRC Press, Boca Raton LA.
- Björnsson, B., Steinarsson, A., Árnason, T., 2007. Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate. Aquaculture 271, 216–226.
- Blaszkowski, C., Moreira, G. S., 1986. Combined effects of temperature and salinity on the survival and duration of larval stages of *Pagurus criniticornis* (Dana) (Crustacea, Paguridae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 103, 77-86.
- Boesch, C., 1992. Clutton-Brock T. H. 1991. The Evolution of Parental Care. J. Evol. Biol. 5, 719–721.
- Bourne, N., Smith, D. W., 1972. The effect of temperature on the larval development of the horse clam, *Tresus capax* (Gould). Proc. Natl. Shellfish. Assoc. 62, 35-37.
- Branford, J. R., 1978a. The influence of day length, temperature, and season on the hatching rhythm of *Homarus gammarus*. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 58, 639-658.
- Branford, J. R., 1978b. Incubation period for the lobster *Homarus gammarus* at various temperatures. Mar. Biol. 47, 363-368.

- Brante, A., Fernández, M., Viard, F., 2011. Microsatellite evidence for sperm storage and multiple paternity in the marine gastropod *Crepidula coquimbensis*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 396, 83–88.
- Britz, P.J., Hecht, T., Mangold, S., 1997. Effect of temperature on growth, feed consumption and nutritional indices of *Haliotis midue* fed a formulated diet. *Aquaculture* 152, 191–203.
- Brodie, J., Fabricius, K., De'ath, G., Okaji, K., 2005. Are increased nutrient inputs responsible for more outbreaks of crown-of-thorns starfish? An appraisal of the evidence. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 266–78.
- Broekhuysen, G. J., 1940. A preliminary investigation of the importance of desiccation, temperature and salinity as factors controlling the vertical distribution of certain intertidal marine gastropods in False Bay, South Africa. *Trans. Roy. Soc. S. Afr.* 28, 254-291.
- Brown, K.M., Alexander, J.E., 1994. Group foraging in a marine gastropod predator: Benefits and costs to individuals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112, 97–106.
- Browne, R.A., Wanigasekera, G., 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 244, 29–44.
- Bullock, T. H., 1955. Compensation for temperature in the metabolism and activity of poikilotherms. *Biol. Rev.* 30, 311-342.
- Butters, T.D., Scudder, P., Rotsaert, J., Petursson, S., Fleet, G.W.J., Willenbrock, R.W., Jacob, G.S., 1991. Purification to homogeneity of *Charonia lampas* α -fucosidase by using sequential ligand-affinity chromatography. *Biochem. J.* 279, 189–195.
- Cadman, L.R., Weinstein, M.P., 1988. Effects of temperature and salinity on the growth of laboratory-reared juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* Rathbun. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 121, 193-207.
- Cañete, J.I., Gallardo, C.S., Céspedes, T., Cárdenas, C.A., Santana, M., 2012. Desarrollo intracapsular, oviposturas y velígeras tempranas del caracol ranélido *Fusitriton magellanicus* (Röding, 1798) en aguas frías del estrecho de Magallanes, Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 40, 914–928.

- CAREFOOT T., H. 1967. Growth and nutrition of *Aplysia punctata* feeding on a variety of marine algae. *Journal of Marine Biological Association, U.K.* 47, 565-589.
- Carefoot, T.H., 1973. Feeding, food preference, and the uptake of food energy by the supralittoral isopod *Ligia pallasii*. *Mar. Biol.* 18, 228–236.
- Carefoot, T.H., Harris, M., Taylor, B.E., Donovan, D., Karentz, D., 1998. Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Mar. Biol.* 130, 389–396.
- Caro, T., 2007. Behavior and conservation: a bridge too far? *Trends Ecol. Evol.* 22, 394–400.
- Carr, W.E., 1967. Chemoreception in the mud snail, *Nassarius obsoletus*. II. Identification of stimulatory substances. *Biol. Bull.* 133, 106–127.
- Castagna, M., Kraeuter, J.N., 1994. Age, growth rate, sexual dimorphism and fecundity of knobbed whelk *Busycon carica* (Gmelin, 1791) in a western mid-Atlantic lagoon system Virginia. *J. Shellfish Res.* 13, 581–585.
- Casterlin, M. E., Reynolds, W.W., 1980. Behavioral response of the New England dog whelk, *Nassarius trivittatus* to a temperature gradient. *Hydrobiologia* 69, 79-81.
- Castilla, J.C., Cancino, J., 1976. Spawning behaviour and egg capsules of *Concholepas concholepas* (Mollusca: Gastropoda: Muricidae). *Mar. Biol.* 37, 255–263.
- Cather, J.N., n.d. Cellular interactions in the development of the shell gland of the gastropod *Ilyanassa*. *J. Exp. Zool. (Part A)* 166, 205-224.
- Cazaux, C., 1972. Ponte et larves du gastéropode prosobranche *Tritonalia nodifer* Lam. *Bull. Soc. Lin. Bord.* 11, 143-148.
- Cerame-Vivas, M. J., Gray, I.E., 1966. The distributional pattern of benthic invertebrates of the continental shelf off North Carolina. *Ecology* 47, 260-270.
- Chaitanawisuti, N., Kritsanapuntu, S., Santaweek, W., 2010. Suitable Initial Body Sizes of Juvenile Spotted Babylon (*Babylonia areolata* L.) for Growing Out

- to Marketable Sizes in a Large-Scale Flow-Through System. *J. Appl. Aquac.* 22, 18–24.
- Charmantier, G., Mounet, R., 1992. Temperature specific rates of embryonic development of the European lobster *Homarus gammarus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 160, 61-66
- Chaparro, O.R., Oyarzun, R.F., Vergara, A.M., Thompson, R.J., 1999. Energy investment in nurse eggs and egg capsules in *Crepidula dilatata* Lamarck (Gastropoda, Calyptraeidae) and its influence on the hatching size of the juvenile. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 232, 261–274.
- Chase, R., 2002. Behavior and its Neural Control in Gastropod Molluscs. Oxford University Press, New York.
- Chatzinikolaou, E., Richardson, C.A., 2010. Parental size and environmental conditions affect egg capsule production by *Nassarius reticulatus* (Linnaeus 1758) (Gastropoda: Nassariidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 390, 14–21.
- Chesher, R.H., 1969. Destruction of pacific corals by the sea star *Acanthaster planci*. *Science* 165, 280–283.
- Chess, R. J., Rosenthal, R. J., 1971. On the reproductive biology of *Mitra idae* (Gastropoda: Mitridae). *Veliger* 14, 172-176.
- Chi, S.Y., Zhou, Q.C., Tan, B.P., Dong, X.H., Yang, Q.H., Zhou, J.B., 2010. Effect of Dietary Protein and Lipid Levels on Growth Performance, Carcass Composition, and Digestive Enzyme of the Juvenile Spotted Babylon, *Babylonia areolata* Link 1807. *J. World Aquac. Soc.* 41, 903–911.
- Chow, V., 1987. Patterns of growth and energy allocation in northern California populations of *Littorina* (Gastropoda: Prosobranchia). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 110, 69–89.
- Christiansen, F.B., Fenchel, T.M., 1979. Evolution of marine invertebrate reproductive patterns. *Theor. Popul. Biol.* 16, 267–282.
- Ciampa, A., Picone, G., Laghi, L., Nikzad, H., Capozzi, F., 2012. Changes in the amino acid composition of Bogue (*Boops boops*) fish during storage at different temperatures by 1H-NMR spectroscopy. *Nutrients* 4, 542–53.

- Clarke, A., 1982. Temperature and embryonic development in polar marine invertebrates. *Int. J. Invertebr. Reprod.* 5, 71-82.
- Clench, W.J., Turner, R.D., 1957. The Family Cymatiidae in the western Atlantic. *Johnsonia* 3, 189-244, pls. 110-135.
- Cockburn, A., 1998. EVOLUTION OF HELPING BEHAVIOR IN COOPERATIVELY BREEDING BIRDS. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 141–177.
- Collin, R., 1995. Sex, Size, and Position: A Test of Models Predicting Size at Sex Change in the Protandrous Gastropod *Crepidula fornicata*. *Am. Nat.* 146, 815–831.
- Conklin, E.G., 1897. The embryology of *Crepidula*. *J. Morphol.* 13, 1-226.
- Council of Europe, 1979. CETS No.:104. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Bern, 19.IX.1979. European Treaty Series 104, 1-26.
- Crim, R.N., Sunday, J.M., Harley, C.D.G., 2011. Elevated seawater CO₂ concentrations impair larval development and reduce larval survival in endangered northern abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 400, 272–277.
- Crisp, M., 1971. Structure and abundance of receptors of the unspecialized external epithelium of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda, Prosobranchia). *J. mar. biol. Ass. U. K.* 51, 865-890.
- Croll, R.P., 1983. Gastropod Chemoreception. *Biol. Rev.* 58, 293–319.
- Croll, R.P., Chase, R., 1977. A long-term memory for food odors in the Land snail, *Achatina fulica*. *Behav. Biol.* 19, 261–268.
- Croll, R.P., Chase, R., 1980. Plasticity of olfactory orientation to foods in the snail *Achatina fulica*. *J. Comp. Physiol. A* 136, 267–277.
- D'Asaro, C.N., 1969. The comparative embryogenesis and early organogenesis of *Bursa corrugata* Perry and *Distorsio clathrata* Lamarck (Gastropoda: Prosobranchia). *Malacologia* 9, 349-389.

- Davis, H.C., Calabrese, A., 1969. Survival and growth of larvae of the European oyster (*Ostrea edulis* L.) at different temperatures. Biol. Bull. 136, 193-199.
- Davis, W.J., Mpitsos, G.J. 1971. Behavioral choice and habituation in the marine mollusc *Pleurobranchaea californica* MacFarland (Gastropoda, Opisthobranchia). Zeitschrift fur vergleichende physiologie 75, 207-223.
- Davis, W.J., Villet, J., Lee, D., Rigler, M., Gillette, R., Prince, E., 1980. Selective and differential avoidance learning in the feeding and withdrawal behavior of *Pleurobranchaea californica*. J. Comp. Physiol. A 138, 157-165.
- Dawirs, R. R., Dietrich, A., 1986. Temperature and laboratory feeding rates in *Carcinus maenas* L. (Decapoda, Portunidae) larvae from hatching through metamorphosis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 99, 133-147.
- De'ath, G., Moran, P., 1998. Factors affecting the behaviour of crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci* L.) on the Great Barrier Reef: J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 220, 83-106.
- Delrioportilla, M. A., Rearaujo, A.D., Voltolina, D., 1992. Growth of the pearl oyster *Pteria sterna* under different thermic and feeding conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser. 89, 221-227.
- Deslous-Paoli, J.-M., Héral, M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. Aquat. Living Resour. 1, 239-249.
- DeSmet, W. H. O., 1985. The effect of temperature on the activity of *Cochlicella acuta* and *Cochlicella ventricosa* (Gastropoda) under experimental conditions. Biol. Jaarb. 53, 153-161.
- Dlaza, T., Maneveldt, G., Viljoen, C., 2008. Growth of post-weaning abalone *Haliotis midae* fed commercially available formulated feeds supplemented with fresh wild seaweed. African J. Mar. Sci. 30, 199-203.
- Doxa C.K., Papadakis I., Kentouri M., Divanach P., 2006. Feeding preference of the Giant Triton *Charonia tritonis variegata* and its contribution to the conservation of the marine environment. AQUA 2006. Linking Tradition and Technology. Highest Quality for the Consumer. WAS and EAS co-organized Annual Conference on Aquaculture. May 9-13 Firenze, 263

- Doxa, C.K., Divanach, P., Kentouri, M., 2013. Consumption rates and digestibility of four food items by the marine gastropod *Charonia sequezea* (Aradas & Benoit, 1870). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 446, 10–16.
- Doxa, C.K., Kentouri, M., Divanach, P., 2012. Feeding of *Charonia sequezea* (Aradas & Benoit, 1870) on natural prey and alternative foods. *J. Molluscan Stud.* 79, 76–78.
- Ducros, C., 1957. Induction of evacuation of sexual products in *Gibbula* (Gastropoda Prosobranchia). *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 151, 285-289.
- Elliott, C.J.H., Susswein, A.J., 2002. Comparative neuroethology of feeding control in molluscs. *J. Exp. Biol.* 205, 877-896.
- Elnor, R. W., Hughes, R. N., 1978. Energy maximization in the diet of the shore crab *Carcinus maenas*. *J. Anim. Ecol.* 41, 103-116.
- Emlen, S.T., 1991. Evolution of cooperative breeding in birds and mammals. *Behav. Ecol. An Evol. Approach.* 301-337.
- Endean, R., 1977. *Acanthaster planci* infestations of reefs of the Great Barrier Reef. *Proc. Third Int. Coral Reef Symp.* 1, 185-191.
- Endean, R., Stablum, W., 1973. A study of some aspects of the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) infestations of reefs of Australia's Great Barrier Reef. *Atoll Res Bull.* 167, 1-60.
- Enderlein, P., 2003. Optimal foraging versus shared doom effects: interactive influence of mussel size and epibiosis on predator preference. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 292, 231–242.
- European Community, 1999. Council Decision of 22 October 1999 on concluding the Protocol concerning specially protected areas and biological diversity in the Mediterranean, and on accepting the annexes to that Protocol (Barcelona Convention). In: *Official Journal of the European Communities*, 14-12-1999, L 322, 1-17.
- Fairweather, P.G., Underwood, A.J., 1983. The apparent diet of predators and biases due to different handling times of their prey. *Oecologia* 56, 169–179.

- Fenchel, T., 1965. Feeding biology of the sea-star *Luidia sarsi* Düben & Koren. *Ophelia* 2, 223–236.
- Floeter, J., Temming, A., 2003. Explaining diet composition of North Sea cod (*Gadus morhua*): prey size preference vs. prey availability. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60, 140–150.
- FLOETER, J., TEMMING, A., 2005. Analysis of prey size preference of North Sea whiting, saithe, and grey gurnard. *ICES J. Mar. Sci.* 62, 897–907.
- Fortes-Silva, R., Rosa, P. V., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F.J., 2012. Dietary self-selection of protein-unbalanced diets supplemented with three essential amino acids in Nile tilapia. *Physiol. Behav.* 105, 639–44.
- Fortes-Silva, R., Sánchez-Vázquez, F.J., 2012. Use of self-feeders to evaluate macronutrient self-selection and energy intake regulation in Nile tilapia. *Aquaculture* 326-329, 168–172.
- Forsythe, J.W., Hanlon, R.T., 1988. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. *Mar. Biol.* 98, 369-379.
- Foster, G.G., Hodgson, A.N., 1998. Consumption and apparent dry matter digestibility of six intertidal macroalgae by *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae). *Aquaculture* 167, 211–227.
- Fox, L. R., and W. W. Murdoch. 1978. Effects of feeding history on short-term and long-term functional responses in *Notonecta hoffmanni*. *J. Anim. Ecol.* 47: 945-959.
- Freeman, S., Herron, J.C., 2003. *Evolutionary analysis*, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Fretter, V. 1984. Prosobranchs. Reproduction. In: *The Mollusca* (Ed. by A.S. Tompa, N.H. Verdonk & J.A.M. Van Den Biggelaar), vol. 7, pp. 1–45. Academic Press, New York, USA.
- Futuyma, D.J., 2005. *Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Gallardo, C.S., Haro, D., Wagner, C., Garrido, O., Cañete, J.I., 2012. Egg-laying behaviour and intracapsular development of *Argobuccinum pustulosum*

- (Gastropoda: Ranellidae) in temperate waters at the South coast of Chile. *Mar. Biol. Res.* 8, 815–828.
- García-Esquivel, Z., Montes-Magallón, S., González-Gómez, M. a., 2007. Effect of temperature and photoperiod on the growth, feed consumption, and biochemical content of juvenile green abalone, *Haliotis fulgens*, fed on a balanced diet. *Aquaculture* 262, 129–141.
- Garling, D.L., Wilson, R.P., 1976. Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.* 106, 1368–1375.
- Gelperin, A., 1975. Rapid food aversion learning by a terrestrial mollusk. *Science*. 189, 567–570.
- Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P., Koumoundouros, G., 2010. Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 308, 13–19.
- Gilchrist, J.S., 2007. Cooperative behaviour in cooperative breeders: costs, benefits, and communal breeding. *Behav. Processes* 76, 100–5.
- Ginsburger-Vogel, T., 1975. Temperature and sexual differentiation in Crustacea. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 100, 95-115.
- Govan, H., 1995. *Cymatium muricinum* and other ranellid gastropods: Major predators of cultured tridacnid clams. ICLARM Tech. Rep. 49, 136p.
- Green, A.J., Jones, C.L.W., Britz, P.J., 2011. The protein and energy requirements of farmed South African abalone *Haliotis midae* L. cultured at optimal and elevated water temperatures. *Aquac. Res.* 42, 1653–1663.
- Hagen, N.A., du Souich, P., Lapointe, B., Ong-Lam, M., Dubuc, B., Walde, D., Love, R., Ngoc, A.H., 2008. Tetrodotoxin for moderate to severe cancer pain: a randomized, double blind, parallel design multicenter study. *J. Pain Symptom Manage.* 35, 420–9.
- Hahn, K.O., 1989. Handbook of Culture of Abalone and Other Marine gastropods. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Halsband-Lenk, C., Hirche, H.-J., Carlotti, F., 2002. Temperature impact on reproduction and development of congener copepod populations. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 271, 121–153.
- Hannon, C., Officer, R.A., Le Dorven, J., 2012. Review of the technical challenges facing aquaculture of the European abalone *Haliotis tuberculata* in Ireland. *Aquac. Int.* 21, 243–254.
- Hatanaka, H., Egami, F., Ishizuka, I., Nagai, Y., 1976. Sulphogalactolipid sulphohydrolase activity of arylsulphatase purified from a marine gastropod *Charonia lampas*. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* 438, 176–185.
- Hatanaka, H., Ogawa, Y., Egami, F., 1975a. Effects of various compounds on the ascorbate 2 sulfate sulfohydrolase and arylsulfatase activities copurified from the liver of *Charonia lampas*. *J. Biochem.* 77, 801–806.
- Hatanaka, H., Ogawa, Y., Egami, F., 1975b. Inhibition of *Charonia lampas* ascorbate 2 sulfate sulfohydrolase activity by adenosine 5' diphosphate and related compounds. *J. Biochem.* 77, 807–810.
- Hatanaka, H., Ogawa, Y., Egami, F., 1976a. Arylsulphatase and glycosulphatase of *Charonia lampas*: substrate specificity towards sugar sulphate derivatives. *Biochem. J.* 159, 445–448.
- Hatanaka, H., Ogawa, Y., Egami, F., 1976b. Two glycosulfatasases from the liver of a marine gastropod, *Charonia lampas*. Partial purification and properties. *J. Biochem.* 79, 27–34.
- Hatchwell, B., Komdeur, J., 2000. Ecological constraints, life history traits and the evolution of cooperative breeding. *Anim. Behav.* 59, 1079–1086.
- Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 1988. Egg capsule structure and hatching mechanism of *Ocenebra erinacea* (L.) (Prosobranchia: Muricidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 119, 269–283.
- Heip, C., Smol., N., 1976. Influence of temperature on the reproductive potential of two brackish-water harpacticoids (Crustacea: Copepoda). *Mar. Biol.* 35, 327–334.

- Henry, J.Q., Perry, K.J., Martindale, M.Q., 2006. Cell specification and the role of the polar lobe in the gastropod mollusc *Crepidula fornicata*. *Dev. Biol.* 297, 295–307.
- Hirst, A.G., Shearer, M., 1997. Are in situ weight-specific growth rates body-size independent in marine planktonic copepods? A re-analysis of the global syntheses and a new empirical model. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 154, 155–165.
- Holling, C. S. 1966. The functional response of invertebrate predators to prey density. *Memoirs Entomological Society of Canada*: 48: 1-86.
- Hosking, R., 1996. Dictionary of Japanese food. Tuttle Publishing, Singapore.
- Hutchings, J.A., Herbert, G.S., 2013. No honor among snails: Conspecific competition leads to incomplete drill holes by a naticid gastropod. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 379-380, 32–38.
- HYMAN L. H. (1967) *The Invertebrates, Vol. VI--Mollusca I.* McGraw-Hill, New York.
- Jager, J.C., 1970. A Quantitative Study of a Chemoresponse To Sugars in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands J. Zool.* 21, 1–59.
- Jamieson, C., Burns, C., 1988. The effects of temperature and food on copepodite development, growth, and reproduction in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *Hydrobiologia* 164, 235-258.
- Kamel, S.J., Grosberg, R.K., 2012. Exclusive male care despite extreme female promiscuity and low paternity in a marine snail. *Ecol. Lett.* 15, 1167–73.
- Kang, K.H., Kim, J.M., 2004. The predation of trumpet shell, *Charonia sp.*, on eight different marine invertebrate species, *Aquac. Res.* 35, 1-5.
- Katsanevakis, S., Lefkadiou, E., Galinou-Mitsoudi, S., Koutsoubas, D., Zenetos, A., 2008. Molluscan species of minor commercial interest in Hellenic seas: Distribution, exploitation and conservation status. *Mediterr. Mar. Sci.* 9, 77-118.
- Kennedy, V.S., Mikulski, J.A., 1993. The Effects of Temperature on Invertebrates and Fish A Selected Bibliography.
<http://www.mdsg.umd.edu/Research/fishtemp.html>

- Kilburn, R. and Rippey, E., 1982. *Sea Shells of Southern Africa*. MacMillan, Johannesburg.
- Kingsley-Smith, P.R., Richardson, C.A., Seed, R., 2003. Size-related and seasonal patterns of egg collar production in *Polinices pulchellus* (Gastropoda: Naticidae) Risso 1826. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 295, 191–206.
- Kisch, B.S., 1949. *Charonia lampas* (L) in the sub-littoral zone. *J Conchol Lond.* 23, 37.
- Kisch, B.S., 1952. Further note on *Charonia lampas* (L). *J Conchol Lond.* 23, 266.
- KOHN, A.J., 1961. CHEMORECEPTION IN GASTROPOD MOLLUSCS. *Integr. Comp. Biol.* 1, 291–308.
- Koumoundouros, G., Pavlidis, M., Anezaki, L., Kokkari, C., Sterioti, A., Divanach, P., Kentouri, M., 2002. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. *J. Exp. Zool.* 292, 573–9.
- Landry, M. R., 1975. The relationship between temperature and the development of life stages of the marine copepod *Acartia clausi* Giesbr. *Limnol. Oceanogr.* 20, 854-857.
- Laughlin, R., 1983. The effects of temperature and salinity on larval growth of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Biol. Bull.* 164, 93-103.
- Laxton, J.H., 1969. Reproduction in some New Zealand cymatiidae (Gastropoda: Prosobranchia). *Zool. J. Linn. Soc.* 48, 237-253
- Laxton, J.H., 1971. Feeding in some Australasian cymatiidae (Gastropoda: Prosobranchia). *Zool. J. Linn. Soc.* 50, 1-9.
- Lima, G. M., Pechenik, J.A., 1985. The influence of temperature on growth rate and length of larval life of the gastropod, *Crepidula plana* Say. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 90, 55-71.
- Linke, O., 1933. Morphologie et physiologie des genitalapparates der nordsee *Littorina*. *Wiss Meeresuntersuch. Abt. Helgoland.* 19, 3-52.
- Lord, A. 1986. Are the contents of egg capsules of the marine gastropod *Nucella lupillus* (L.) axenic? *Am. Malacol. Bull.*, 4, 201-203.

- Lyu, Y.S., Park, S.K., Chung, K., Chung, J.M., 2000. Low dose of tetrodotoxin reduces neuropathic pain behaviors in an animal model. *Brain Res.* 871, 98–103.
- MacKay, D.C.G., 1943. Temperature and the world distribution of crabs of the genus *Cancer*. *Ecology* 24, 113-115.
- Mäkinen, T., Panova, M., André, C., 2007. High levels of multiple paternity in *Littorina saxatilis*: hedging the bets? *J. Hered.* 98, 705–11.
- Marcil, J., Walczak, J.-S., Guindon, J., Ngoc, A.H., Lu, S., Beaulieu, P., 2006. Antinociceptive effects of tetrodotoxin (TTX) in rodents. *Br. J. Anaesth.* 96, 761–8.
- McBride, C.J., Williams, A. H., Henry R. P., 1989. Effects of temperature on climbing behavior of *Littorina irrorata*: on avoiding a hot foot. *Mar. Behav. Physiol.* 14, 93-100.
- McLachlan, A., Young, N., 1982. Effects of low temperature on the burrowing rates of four sandy beach molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 65, 275-284.
- McLean, M., 1999. *Weavers of Song: Polynesian Music & Dance*. Auckland University Press, Auckland.
- McMahon, R. F., 1975. Effects of artificially elevated water temperatures on the growth, reproduction and life cycle of a natural population of *Physa virgata* Gould. *Ecology* 56, 1167-1175.
- Melatunan, S., Calosi, P., Rundle, S., Widdicombe, S., Moody, A., 2013. Effects of ocean acidification and elevated temperature on shell plasticity and its energetic basis in an intertidal gastropod. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 472, 155–168.
- Micheli, F., 1995. Behavioural Plasticity in Prey-Size Selectivity of the Blue Crab *Callinectes sapidus* Feeding on Bivalve Prey. *J. Anim. Ecol.* 64, 63–74.
- Miranda, R.M., Oba, T., Goshima, S., 2009. Effect of water temperature and diet on growth and mortality of *Neptunea arthritica* juveniles. *Aquac. Res.* 40, 428–436.

- Montoya, A., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F.J., 2012. Dietary selection by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) provided with unbalanced mixed-macronutrient feeds dispensed from self-feeders. *Aquaculture* 358-359, 35–40.
- Morse, A. N. C., 1991. How do planktonic larvae know where to settle? *Am Scient.* 79, 154-167.
- Morton, B., 2012. Foregut anatomy and predation by *Charonia lampas* (Gastropoda: Prosobranchia: Neotaenioglossa) attacking *Ophidiaster ophidianus* (Asteroidea: Ophidiasteridae) in the Açores, with a review of triton feeding behaviour. *J. Nat. Hist.* 46, 2621–2637.
- Mpitsos, G.J., Collins, S.D., 1975. Learning: rapid aversive conditioning in the gastropod mollusk *Pleurobranchaea*. *Science* 188, 954–957.
- Mpitsos, G.J., Collins, S.D., McClellan, A.D., 1978. Learning: A model system for physiological studies. The laws of learning and the design of behavioral criteria must be aimed at testing cellular hypotheses. *Science* 199, 497–506.
- MURDOCH, W., W., 1969. Switching in general predators: experiments on predator specificity and stability of prey populations. *Ecol. Monogr.* 39, 335-354.
- Naylor, E., 1963. Temperature relationships of the locomotor rhythm of *Carcinus*. *J. Exp. Biol.* 40, 669-679.
- Newcomb, J.M., Lawrence, K.A., Watson, W.H., 2004. The influence of light on locomotion in the gastropod *Melibe leonina*. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 37, 253–269.
- Newell, R.C., Branch, G.M., 1980. *Advances in Marine Biology Volume 17, Advances in Marine Biology*, Advances in Marine Biology. Elsevier.
- Nieto, F.R., Cobos, E.J., Tejada, M.Á., Sánchez-Fernández, C., González-Cano, R., Cendán, C.M., 2012. Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain. *Mar. Drugs* 10, 281–305.
- Noble, W.J., Benkendorff, K., Harris, J.O., 2013. Growth, settlement and survival of *Dicathais orbita* (Neogastropoda, Mollusca) larvae in response to temperature, diet and settlement cues. *Aquac. Res.* 46, 1455-1468.

- Noisette, F., Comtet, T., Legrand, E., Bordeyne, F., Davoult, D., Martin, S., 2014. Does encapsulation protect embryos from the effects of ocean acidification? The example of *Crepidula fornicata*. PLoS One 9, e93021.
- Nugranad, J., Chantrapornsilp, S., Varapibal, T., 2000. Feeding and spawning behaviour of the trumpet triton, *Charonia tritonis* (L., 1758) in captivity. Phuket Mar. Biol. Cent. Spec. Publ. 21, 51-56.
- Nugranad J, Promjinda K, Varapibal T, Chantara S. 2001. Reproduction of the trumpet triton *Charonia tritonis* (Mollusca: Gastropoda) in captivity. Phuket Mar. Biol. Cent. Spec. Publ. 25, 153–160.
- O'Mahoney, M., Rice, O., Mouzakitis, G., Burnell, G., 2014. Towards sustainable feeds for abalone culture: Evaluating the use of mixed species seaweed meal in formulated feeds for the Japanese abalone, *Haliotis discus hannai*. Aquaculture 430, 9–16.
- Omana-Zapata, I., Khabbaz, M.A., Hunter, J.C., Clarke, D.E., Bley, K.R., 1997. Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons. Pain 72, 41–49.
- Onitsuka, T., Kimura, R., Ono, T., Takami, H., Nojiri, Y., 2014. Effects of ocean acidification on the early developmental stages of the horned turban, *Turbo cornutus*. Mar. Biol. 161, 1127–1138.
- Paine, R.T., 1969. Pisaster–Tegula interaction — prey patches, predator food preference, and intertidal community structure, Ecology 50, 950–961.
- Paine, R.T., 1980. Food webs: linkage, interaction strength and community infrastructure. J. Anim. Ecol. 49, 667-685.
- Palacios, K.C., Ferraro, S.P., 2003. Green crab (*Carcinus maenas* Linnaeus) consumption rates on and prey preferences among four bivalve prey species. J. Shellfish Res. 22, 865–871.
- Palmegiano, G. B., D'Apote, M.P., 1983. Combined effects of temperature and salinity on cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) hatching. Aquaculture 35, 259-264.
- Pastorok, R. A., 1980. The effects of predator hunger and food abundance on prey selection by *Chaoborus* larvae. Limnol. Oceanogr. 25, 910–921.

- Pauly, D., Pullin, R.V., 1988. Hatching time in spherical, pelagic, marine fish eggs in response to temperature and egg size. *Environ. Biol. Fishes* 22, 261–271.
- Pechenik, J.A. 1978. Adaptations to intertidal development: studies on *Nassarius obsoletus*. *Biol. Bull.* 154, 282-291.
- Pechenik, J.A. 1979. The role of encapsulation in invertebrate life histories. *Am. Nat.* 114, 859–870.
- Pechenik, J.A. 1982. Ability of some gastropod egg capsules to protect against low-salinity stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 63, 195-208.
- Pechenik, J.A. 1983. Egg capsules of *Nucella Iupillus* (L.) protect against low-salinity stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 71, 165-179.
- Pechenik, J. A., 1984a. Influence of temperature and temperature shifts on the development of chiton larvae, *Mopalia muscosa*. *Int. J. Invert. Reprod. Devel.* 7, 3-12.
- Pechenik, J. A., 1984b. The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic existence in larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 74, 241-257.
- Pechenik, J.A. 1986. The encapsulation of eggs and embryos by molluscs: an overview. *Am. Malacol. Bull.* 4, 165–172.
- Pechenik, J.A., Eyster, L.S., Widdows, J., Bayne, B.L., 1990. The influence of food concentration and temperature on growth and morphological differentiation of blue mussel *Mytilus edulis* L. larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 136, 47-64.
- Pennings, S.C., 1991. Reproductive behavior of *Aplysia californica* Cooper: diel patterns, sexual roles and mating aggregations. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 149, 249–266.
- Percharde, P.L., 1972. Observations on the gastropod, *Charonia variegata*, in Trinidad and Tobago, *Nautilus* 85, 84-92.
- Peres, R., Amaral, F.G., Marques, A.C., Neto, J.C., 2014. Melatonin production in the sea star *Echinaster Brasiliensis* (Echinodermata). *Biol. Bull.* 226, 146–151.

- Perron, F.E., 1981. The Partitioning of Reproductive Energy between Ova and Protective Capsules in Marine Gastropods of the Genus *Conus*. *Am. Nat.* 118, 110–118.
- Perron, F.E., Corpuz, G.C., 1982. Costs of parental care in the gastropod *Conus pennaceus*: Age-specific changes and physical constraints. *Oecologia* 55, 319–324.
- Pomeroy, R.S., Parks, J.E., Balboa, C.M., 2006. Farming the reef: is aquaculture a solution for reducing fishing pressure on coral reefs? *Mar. Policy* 30, 111–130.
- Potts D.C., 1981. Crown of thorns starfish: man-induced pest or natural phenomenon? In: Kitching, R.L., Jones, R.E. (Eds.), *The Ecology of Pests*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne, pp. 55-86.
- Poulos, S.E., Drakopoulos, P.G., Collins, M.B., 1997. Seasonal variability in sea surface oceanographic conditions in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean): an overview. *J. Mar. Syst.* 13, 225–244.
- Przeslawski, R., Davis, A.R., Benkendorff, K., 2004. Effects of ultraviolet radiation and visible light on the development of encapsulated molluscan embryos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 268, 151–160.
- Purchon, R.D. 1977. *The Biology of the Mollusca*. Pergamon, New York.
- Purdom, C. E., 1977. Fish cultivation research. Laboratory Leaflet (new series), Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 35. 28 pp.
- Rabí, M., Maraví, C., 1997. Growth curves and specific growth rate of *Concholepas concholepas* (Bruguière , 1789) (Gastropoda : Muricidae) in culture experiments. *Sci. Mar.* 61, 49–53.
- Ramón, M., 1991. Spawning and development characteristics of *Cymatium Cutaceum* and *C. corrugatum* (Gastropoda: Prosobranchia) in the laboratory. *Ophelia* 33, 31–43.
- Rawlings, T.A., 1996. Shields against ultraviolet radiation: An additional protective role for the egg capsules of benthic marine gastropods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 136, 81–95.

- Reynolds, W. W., Casterlin, M. E., 1979. Behavioral thermoregulation and locomotor activity in the lobster *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A, 25-28.
- Roberts, D.J., Hughes, R.N., 1980. Growth and reproductive rates of *Littorina rudis* from three contrasted shores in North Wales, UK. *Mar. Biol.* 58, 47–54.
- Roller, R.A., Stickle, W.B., 1989. Temperature and salinity effects on the intracapsular development, metabolic rates, and survival to hatching of *Thais haemastoma canaliculata* (Gray) (Prosobranchia:Muricidae) under laboratory conditions. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 125, 235–251.
- Romero, M., Lohrmann, K., Bellolio, G., Dupre, E., 2003. Comparative observations on reproduction, spawning, and early veligers of three common subtidal mesogastropods from North Central Chile. *Veliger* 46, 50–59.
- Rosenthal, R.J., 1970. Observations on the reproductive biology of the Kellet's Whelk, *Kelletia kelletii*. *The Veliger*, 12, 319–324.
- Roth, A.A., 1960. Aspects of the Function of the Bursa Copulatrix and Seminal Receptacle in the Prosobranch Snail *Oncomelania formosana* Pilsbry and Hirase. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 79, 412–419.
- Russo, G.F., Fasulo, G., Toscano, A., Toscano, F., 1990. On the presence of Triton species (*Charonia spp.*) (Mollusca Gastropoda) in the Mediterranean Sea: Ecological considerations. *Boll. Malacol.* 26, 91-104.
- Scheltema, R.S., 1966. Evidence for trans-Atlantic transport of gastropod larvae belonging to the genus *Cymatium*. *Deep. Res. Oceanogr. Abstr.* 13.
- Scheltema RS. 1971a. Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow waters benthic marine gastropods. *Biol. Bull.* 140:284-322.
- Scheltema RS. 1971b. The dispersal of the larvae of shoalwater benthic invertebrate species over long distances by ocean currents. In: PJ Crisp editor. Fourth European Marine Biology Symposium. Cambridge: Cambridge University Press, p 7-28.
- Shaltout, M., Omstedt, A., 2014. Recent sea surface temperature trends and future scenarios for the Mediterranean Sea. *Oceanologia* 56, 411–443.

- Shiell, G.R., Knott, B., 2008. Diurnal observations of sheltering behaviour in the coral reef sea cucumber *Holothuria whitmaei*. Fish. Res. 91, 112–117.
- Shiu, Y.C., 2003. Occurrence of tetrodotoxin in the causative gastropod *Polinices idyma* and another gastropod *Natica lineata* collected from Western Taiwan. J. Food Drug Anal. 11, 159-163.
- Sicuro, B., Piccinno, M., Gai, F., Abete, M.C., Danieli, A., Dapra, F., Mioletti, S., Vilella, S., 2012. Food Quality and Safety of Mediterranean Sea Cucumbers *Holothuria tubulosa* and *Holothuria polii* in Southern Adriatic Sea. Asian J. Anim. Vet. Adv. 7, 851–859.
- Spight, T.M., 1977. Do intertidal snails spawn in the right places? Evolution 31, 682-691.
- Spight, T.M., Emlen, J., 1976. Clutch sizes of two marine snails with a changing food supply. Ecology 57, 1162-1178.
- Steinberg, P.D., 1985. Feeding Preferences of *Tegula funebris* and Chemical Defenses of Marine Brown Algae. Ecol. Monogr. 55, 333–349.
- Stickle, W.B., Moore, M.N., Bayne, B.L., 1985. Effects of temperature, salinity and aerial exposure on predation and lysosomal stability of the dogwhelk *Thais (Nucella) lapillus* (L.). J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 93, 235–258.
- Strathmann, M.F., Strathmann, R.R., 2007. An extraordinarily long larval duration of 4.5 years from hatching to metamorphosis for teleplanic veligers of *Fusitriton oregonensis*. Biol. Bull. 213, 152–159.
- Struhsaker, J.W., 1966. Breeding, spawning periodicity and early development in the Hawaiian *Littorina*: *L. pintado* (Wood), *L. picta* Philippi and *L. scabra* (Linné), Proc. Malac. Soc. Lond. 37, 137-166.
- Sun, L., Chen, H., 2014. Effects of water temperature and fish size on growth and bioenergetics of cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture 426-427, 172–180.
- Sutherland, W., 1998. The importance of behavioural studies in conservation biology. Anim. Behav. 56, 801–809.

- Svetlichnyi, L. S., 1989. Temperature influence on locomotor activity of *Calanus helgolandicus*. *Okeanologiya* 29, 502-507.
- Swaisgood, R.R., 2007. Current status and future directions of applied behavioral research for animal welfare and conservation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 102, 139–162.
- Tang, B., Yin, F., Gui, C., Chen, X., Liu, B., 2012. Hatching, growth and hatchling dietary preference in *Hemifusus ternatanus* (Gmelin, 1791). *Aquaculture* 326-329, 141–147.
- Teshima, S., Kanazawa, A., Hyodo, S., Ando, T., 1979. Sterols of the triton, *Charonia tritonis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem.* 64, 225–228.
- Tettelbach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the northern bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biol.* 63, 249–256.
- Thomassin, B.A., 1976. Feeding behaviour of the felt-, sponge-, and coral-feeder sea stars, mainly *Culcita schmideliana*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 28, 51–65.
- Thorson, G., 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.* 25, 1-45.
- Thrusty, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205, 203–219.
- Tompa, A.S., Verdonk, N.H. & van den Biggelaar, J.A.M. 1984. *The Mollusca*, vol. 7. Reproduction. Academic Press, London
- ULLER, T., OLSSON, M., 2008. Multiple paternity in reptiles: patterns and processes. *Mol. Ecol.* 17, 2566–2580.
- Valverde, J., Martínez-Llorens, S., Vidal, A., Jover, M., Rodríguez, C., Estefanell, J., Gairín, J., Domingues, P., Rodríguez, C., García, B., 2013. Amino acids composition and protein quality evaluation of marine species and meals for feed formulations in cephalopods. *Aquac. Int.* 21, 413–433. 6

- Vidal, J., Division, O.S., 1980. Physioecology of Zooplankton . I . Effects of Phytoplankton Concentration , Temperature , and Body Size on the Growth Rate of *Calanus pacificus* and *Pseudocalanus sp.* Mar. Biol. 134, 111–134.
- Vine P.J., 1973. Crown of thorns (*Acanthaster planci*) plagues: the natural causes theory. Atoll Res. Bull. 166, 1–10.
- Wang, D.D., 1997. Fin-de-Siecle Splendor: Repressed Modernities of Late Qing Fiction, 1849-1911. Stanford University Press, Palo Alto, CA.
- Walker, D., Power, A.J., Sweeney-Reeves, M., Avise, J.C., 2006. Multiple paternity and female sperm usage along egg-case strings of the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca; Melongenidae). Mar. Biol. 151, 53–61.
- Ware, D. M. (1972). Predation by rainbow trout: the influence of hunger, prey density and prey size. J. Fish. Res. Bd Can. 30: 787-797
- Webber, H. H. 1977. Gastropoda: Prosobranchia. Pp. 1-97 (Chap. 1) in Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. IV, A. C. Giese and J. S. Pearse, eds. Academic Press, New York. 369 pp.
- Wells, F.E., 1970. An ecological study of two sympatric species of *Fasciolaria* (Mollusca: Gastropoda) in Alligator Harbor, Florida. Veliger 13, 95-108.
- Widdows, J., 1973. The effects of temperature on the metabolism and activity of *Mytilus edulis* Neth. J. Sea Res. 7, 387-398.
- Wu, G., Mai, K., Tan, B., Zhu, W., 2002. Dietary biotin requirement of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. J. Shellfish Res. 21, 211–217.
- Xue, D., Zhang, T., Liu, J.-X., 2014. Microsatellite evidence for high frequency of multiple paternity in the marine gastropod *Rapana venosa*. PLoS One 9, e86508.
- Zhang, L.-P., Xia, J.-J., Peng, P.-F., Li, H.-P., Luo, P., Hu, C.-Q., 2013. Characterization of embryogenesis and early larval development in the Pacific triton, *Charonia tritonis* (Gastropoda: Caenogastropoda). Invertebr. Reprod. Dev. 57, 237–246.

- Zhou, Y.C., Chen, G.H., Pan, J.P., n.d. Study on the *Cymatium pileare* I. Reproduction and larval development characteristics. Acta Ocean. Sin. 22, 97-104.
- Zimmer, R.K., Butman, C.A., 2000. Chemical signaling processes in the marine environment. Biol. Bull. 198, 168–187.
- Zlatanov, S., Laskaridis, K., Sagredos, A., 2009. Determination of proximate composition, fatty acid content and amino acid profile of five lesser-common sea organisms from the Mediterranean Sea. Int. J. Food Sci. Technol. 44, 1590–1594.

8. Περίληψη

Το φυσικό αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν ο προσδιορισμός των βιολογικών απαιτήσεων του τρίτωνα *Charonia seigneziae* (Aradas & Benoit, 1870) προκειμένου να επιτευχθεί η συντήρηση υπό συνθήκες «ευζωίας» (welfare) ενηλίκων ατόμων και η αναπαραγωγή. Οι επιστημονικοί στόχοι ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις ενότητες που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα του κύκλου ζωής των τριτώνων παρέχοντας πληροφορίες που αφορούν στην βιολογία και οικολογία του είδους.

Η πρώτη ενότητα ασχολήθηκε με τον προσδιορισμό των διατροφικών απαιτήσεων (ποσοτικών και ποιοτικών), της προτίμησης και της συμπεριφοράς διατροφής των τριτώνων υπό τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (17, 20, 23°C). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τρίτωνα κατανάλωσαν όλες τις τροφές που τους χορηγήθηκαν (φυσικά θηράματα και εναλλακτικές τροφές) εμφανίζοντας πολύ υψηλό βαθμό διατροφικής «ευελιξίας» και προσαρμοστικότητας. Αν και κατανάλωσαν όλες τις τροφές που τους χορηγήθηκαν, υπήρξε έκδηλη προτίμηση για ολοθούρια τα οποία όμως δεν αποτελούν την τροφή με την οποία τρέφονται αποκλειστικά οι τρίτωνα αλλά προτιμούν να τρέφονται με ποικιλία τροφών. Όσον αφορά στις ποσοτικές διατροφικές απαιτήσεις των τριτώνων, η ημερήσια κατανάλωση τροφής των τριτώνων, *Charonia seigneziae*, κυμάνθηκε μεταξύ 0,32 με 3,67% του βάρους τους, και εξαρτήθηκε από το είδος τροφής και την θερμοκρασία. Τα ολοθούρια ήταν η τροφή με τους καλύτερους διατροφικούς δείκτες και οι 23°C η βέλτιστη θερμοκρασία.

Στην δεύτερη ενότητα μελετήθηκε η συμπεριφορά θήρευσης των τριτώνων και η ημερονύκτια δραστηριότητά τους. Η γνώση του προτύπου θήρευσης και η αλληλεπίδρασή του με την ημερονύκτια συμπεριφορά του *C. seigneziae* θα βοηθήσει στον σχεδιασμό στρατηγικών παρακολούθησης και τεχνικών απογραφής του πληθυσμού. Οι τρίτωνα εμφάνισαν το πρότυπο της ενεργής θήρευσης. Κατά τη διάρκεια της θήρευσης οι τρίτωνα αύξησαν την ταχύτητα με την οποία κινούνταν, η οποία είναι υπερδιπλάσια της ταχύτητας του θηράματος (ολοθούριο). Όσον αφορά στην ημερονύκτια δραστηριότητα των τριτώνων, επηρεάστηκε από την πλήρωση του στομάχου με τα νηστικά άτομα να είναι πιο δραστήρια από αυτά που βρίσκονται στη

χώνεψη. Ένας άλλος παράγοντας που επηρέασε την ημερονύχτια δραστηριότητα ήταν το φως με τους τρίτωνες να είναι πιο δραστήριοι κατά τη διάρκεια της μέρας.

Η τρίτη ενότητα αφορά στην αναπαραγωγή των τριτώνων, και παρέχει σημαντικές πληροφορίες που αφορούν στην βιολογία, συμπεριφορά και οικολογία τους, όπως το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο αναπαράγονται (20 έως 23 °C) και η εκδήλωση γονικής φροντίδας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν δύο πτυχές της βιολογίας τους, η πολυανδρία που εμφανίζουν τα θηλυκά άτομα, και η εκδήλωση συνεργατικής φροντίδας των εμβρυικών σάκων που θέτει νέα ερωτήματα τόσο σε οικολογικό, όσο και εξελικτικό επίπεδο.

Η τέταρτη ενότητα αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας και του μεγέθους της μητέρας στην γονιμότητα και στην εμβρυική ανάπτυξη. Το μέγεθος της μητέρας αν και σχετίστηκε άμεσα με τις διαστάσεις των σάκων δεν επηρέασε με τον ίδιο τρόπο τη γονιμότητα. Η θερμοκρασία αν και δεν επηρέασε τη γονιμότητα, έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των εμβρύων, τόσο όσον αφορά στην ταχύτητα της ανάπτυξης και το μέγεθος των εμβρύων όσο και στην ανάπτυξη παραμορφώσεων. Από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των δύο τελευταίων ενοτήτων προκύπτει ότι οι τρίτωνες επενδύουν στην παραγωγή πολλών απογόνων, παρέχοντάς τους προστασία τοποθετώντας τα έμβρυα σε προστατευτικούς σάκους τους οποίους συνεχίζουν να προστατεύουν και να περιποιούνται. Ταυτόχρονα, εξασφαλίζουν την ευρεία εξάπλωση των απογόνων τους με την ύπαρξη μιας μακροχρόνιας πελαγικής προνύμφης.

Η θερμοκρασία επηρέασε όλα τα μελετημένα στάδια της ζωής των τριτώνων. Οι 20 με 23°C αποτελούν το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος όσον αφορά τη διατροφή, την αναπαραγωγή και την εμβρυική ανάπτυξη. Αντίθετα η διαβίωση στους 17 °C αποδείχθηκε προβληματική όσον αφορά τη διατροφή, ενώ δεν αποτελεί μέρος του θερμοκρασιακού εύρους στο οποίο αναπαράγονται οι τρίτωνες και οδηγεί στην εμφάνιση μεγάλου ποσοστού παραμορφώσεων κατά την εμβρυική ανάπτυξη (όταν εφαρμόστηκε σε πρώιμο στάδιο της οντογένεσης).

9. Abstract

The present study aimed to determine the biological requirements of the triton *Charonia sequestrata* (Aradas & Benoit, 1870) in order to maintain adult individuals under welfare conditions and reproduce. The scientific objectives were grouped into four modules that cover a wide range of the life cycle of the triton providing information about its biology and ecology.

The first module concerned the nutritional requirements (quantitative and qualitative), feeding preference and feeding behavior of the tritons under three different temperatures (17, 20, 23°C). The results showed that the tritons consumed all the foods that were provided (natural preys and alternative foods) displaying high levels of feeding adaptation and "flexibility". Although tritons preferred consuming sea cucumbers, in the majority of the trials they preferred to feed on a variety of species. Regarding quantitative nutritional requirements of the tritons, the daily food consumption of tritons, *Charonia sequestrata*, ranged from 0.32 to 3.67% of their weight, and depended on the type of food and the temperature. Sea cucumbers were the food with the best nutritional indexes and 23°C the optimal temperature.

In the second module, the predation behavior of tritons and day and night activity were studied. The knowledge of the predation pattern and its interaction with the day and night activity of *C. sequestrata* will contribute to the design of monitoring strategies and census techniques. The tritons follow the pattern of active predation. During predation, tritons increase their moving speed, which is more than twice the speed of the prey (sea cucumber). The day and night activity of the tritons was affected by the stomach repletion with the fasted individuals being more active than the saturated ones. Another factor that affected day-night activity was light with the tritons being more active during the day.

The third module concerned the reproduction of tritons and provided important information on their biology, behavior and ecology, such as the temperature range in which reproduced (20 to 23°C) and the demonstration of parental care. Two aspects of their biology were of particular interest, polyandry demonstrated by the females, and collaborative care of embryonic sacks posed new questions both in ecological and evolutionary level.

The fourth module concerned the effect of temperature and maternal size on fertility levels and embryonic development. Although the maternal size affected the egg-capsules dimensions with the larger individuals laying larger capsules, fertility levels were not affected the same way. The temperature did not affect fertility, but had a crucial role in embryonic development, affecting developmental time, embryonic size and deformities. The combined results of the two previous modules showed that the tritons invest in producing many offsprings, offering them protection by placing the embryos in protective capsules which they continue to protect and nourish. At the same time, they ensure a wide dispersal of their offsprings through the existence of a long pelagic larval stage.

Temperature affected all the studied life stages of the tritons. The optimal temperature, in terms of nutrition, reproduction and embryonic development, ranged from 20 to 23°C. On the other hand, maintenance at 17°C proved problematic concerning tritons' nutrition, was out of the temperature range in which the tritons reproduce and led to the emergence of a large deformation rate during embryonic development (when applied at an early stage of ontogenesis).