

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Τροφικές προτιμήσεις και ρυθμοί κατανάλωσης τροφής προνυμφών
Trichoptera»**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΕΩΡΓΟΥΛΑΣ

ΒΟΛΟΣ 2009

**«Τροφικές προτιμήσεις και ρυθμοί κατανάλωσης τροφής προνυμφών
Trichoptera»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) **Δημήτριος Σταμόπουλος**, Καθηγητής, Ζωολογία και Υδρόβια Εντομολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,
- 2) **Δημήτριος Βαφείδης**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Νικόλαος Παπαδόπουλος**, Επίκουρος Καθηγητής, Εντομολογία και Γεωργική Ζωολογία, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Καθηγητή κ. Δημήτριο Σταμόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τον Μόνιμο Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Βαφείδη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Παπαδόπουλο.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Πρόεδρο του Τμήματος Καθηγητή κ. Χρήστο Νεοφύτου για τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του στη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τον κ. Χρήστο Ρούμπο για την άμεση, ανιδιοτελή και αμέριστη συμπαράστασή του καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιαρη και τον Λέκτορα κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την βοήθεια τους στις μετρήσεις με το ειδικό δυναμόμετρο και στην εξέταση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (SEM), αντίστοιχα. Ομοίως, τον Καθηγητή κ. Κων/νο Κίττα και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Έλενα Μεντέ για την διάθεση των εργαστηριακών αιθουσών τους, καθώς και τον Λέκτορα κ. Χρήστο Λύκα και τον Διδάσκων κ. Βασίλειο Καραλάζο για την βοήθειά τους στην χρήση των μεθόδων Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) και Kjeldahl, αντίστοιχα. Εξίσου

ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Νάνο, την κα Ελένη Πλιακώνα και την κα Περσεφόνη Μαλέτσικα για την βοήθειά τους στις χημικές αναλύσεις των φύλλων που δοκιμάστηκαν στην εργασία αυτή.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν εργαστηριακά οι ρυθμοί κατανάλωσης τεσσάρων διαφορετικών τροφών από τις προνύμφες του Τριχοπτέρου *Micropterna sequax*, οι τροφικές προτιμήσεις τους, καθώς και οι παράγοντες που τις επηρεάζουν. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν ως τροφή των προνυμφών φύλλα από τέσσερα διαφορετικά είδη δέντρων της περιοχής, στην οποία το έντομο ενδιαιτάται, τα οποία ήταν: καστανιάς (*Castanea sativa* – Οικ. Fagaceae), βελανιδιάς (*Quercus frainetto* – Οικ. Fagaceae), οξιάς (*Fagus sylvatica* – Οικ. Fagaceae) και πλατάνου (*Platanus orientalis* – Οικ. Platanaceae). Η συλλογή των προνυμφών της *M. sequax* πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο του 2009 από το ρέμα Κοντόρεμα, του όρους Πήλιο (1015 m υψόμετρο) και αφέθηκαν για τρεις ημέρες πριν την έναρξη των πειραμάτων σε συνθήκες εργαστηρίου, προκειμένου να εγκλιματιστούν. Τα φύλλα που δοκιμάστηκαν, συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή και αποθηκεύτηκαν στεγνά στο εργαστήριο. Δύο εβδομάδες πριν την έναρξη των πειραμάτων, τοποθετήθηκαν σε ένα τοπικό ρέμα, προκειμένου να επιτευχθεί ο μικροβιακός τους αποικισμός (conditioning) και ακολούθως, κάποια από αυτά χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η χημική τους σύσταση, η σκληρότητα τους και να επιβεβαιωθεί η παρουσία πιθανών μικροβιακών αποικιών.

Για τη διερεύνηση του ρυθμού κατανάλωσης των διαφορετικών τροφών, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα σε συνθήκες εργαστηρίου για δέκα ημέρες, όπου οι προνύμφες της *M. sequax* τράφηκαν αποκλειστικά με μία από τις τέσσερις τροφές (πείραμα μη επιλογής). Λόγω του έντονου προβληματισμού που διατυπώνεται στην βιβλιογραφία όσον αφορά στα πειράματα για τον έλεγχο των τροφικών προτιμήσεων,

προτιμήθηκε στην παρούσα εργασία η μελέτη των τροφικών προτιμήσεων των προνυμφών στις τέσσερις διαφορετικές τροφές να γίνει με τις εξής δύο προσεγγίσεις: στην 1^η οι προνύμφες είχαν να επιλέξουν ανάμεσα και στα τέσσερα είδη φύλλων (πείραμα πολλαπλής επιλογής), ενώ στη 2^η οι προνύμφες είχαν να επιλέξουν ανάμεσα σε δύο είδη φύλλων κάθε φορά, από τα τέσσερα που δοκιμάστηκαν (πείραμα επιλογής κατά ζεύγη). Τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες εργαστηρίου για δέκα ημέρες.

Στο πείραμα της μη επιλογής, οι προνύμφες της *M. sequax* προτιμούσαν να καταναλώνουν ημερησίως διπλάσιες ποσότητες φύλλων καστανιάς, έναντι των υπόλοιπων. Στο πείραμα πολλαπλής επιλογής, οι προνύμφες προτιμούσαν να καταναλώνουν ημερησίως φύλλα καστανιάς σε σχεδόν τετραπλάσιες ποσότητες, έναντι των φύλλων βελανιδιάς και πλατάνου, ενώ φαίνεται να προτιμούσαν ελάχιστα τα φύλλα οξιάς. Στα πειράματα όπου η επιλογή γινόταν κατά ζεύγη, όπως και προηγουμένως, οι προνύμφες προτιμούσαν να καταναλώνουν ημερησίως φύλλα καστανιάς σε πολλαπλάσιες ποσότητες, έναντι των υπολοίπων. Η μόνη διαφορά στις παρατηρήσεις εμφανίστηκε όταν οι προνύμφες είχαν να επιλέξουν μεταξύ οξιάς και πλατάνου, όπου η ημερήσια κατανάλωση φύλλων οξιάς ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πλατάνου (αντίθετα με ότι παρατηρήθηκε στο πείραμα πολλαπλής επιλογής). Σε όλα τα πειράματα, η ύπαρξη μικροβιακών αποικιών ήταν παρούσα στα φύλλα όλων των ειδών που δοκιμάστηκαν, ενώ τα φύλλα καστανιάς ήταν τα λιγότερο σκληρά και υπερτερούσαν σε θρεπτικά στοιχεία έναντι των υπολοίπων. Οι διαφορές στις προτιμήσεις και το ρυθμό καταναλώσης διαφορετικών τροφών έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές, σε παρόμοια πειράματα και φαίνεται να οφείλονται σε μεγάλο βαθμό είτε στις διαφορετικές

συγκεντρώσεις των φύλλων σε θρεπτικά στοιχεία είτε στη διαφορετική σκληρότητα τους είτε στην επίδραση του μικροβιακού αποικισμού.

Σε όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν, ένα ποσοστό προνυμφών *M. sequax* νυμφώνονταν κατά τη διάρκειά τους (από 10 έως 40 %). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η νύμφωση μπορεί να αποτελέσει έναν επιπλέον δείκτη ποιότητας των τροφών και στα πειράματά μας το μεγαλύτερο ποσοστό νύμφωσης παρατηρήθηκε όταν οι προνύμφες διατρέφονταν με φύλλα οξιάς, στα οποία καταγράφηκαν και οι μικρότερες ημερήσιες καταναλώσεις.

Συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί ότι το είδος και η ποιότητα της τροφής φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τις τροφικές προτιμήσεις και το ρυθμό κατανάλωσης των τροφών από τις προνύμφες *M. sequax*. Το θρεπτικό περιεχόμενο της κάθε τροφής, καθώς και η σκληρότητα των φύλλων φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την προτίμηση και την κατανάλωσή της από τις προνύμφες. Σε κάθε περίπτωση, όμως, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω παραγόντων, αλλά και άλλων (όπως η θερμοκρασία του νερού, η διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού, η ύπαρξη πιθανών αποκρουστικών βρώσεως κ.λπ.) που μπορεί να επηρεάζουν τις τροφικές προτιμήσεις και τους ρυθμούς κατανάλωσης των προνυμφών της *M. sequax*.

Λέξεις κλειδιά: Trichoptera, *Micropterna sequax*, ρέμα Κοντόρεμα, ρυθμός κατανάλωσης τροφών, τροφικές προτιμήσεις, χημική σύσταση φύλλων, σκληρότητα φύλλων, μικροβιακός αποικισμός.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1. Ο ρόλος των υδρόβιων εντόμων στην τροφική αλυσίδα.....	14
1.1.1. Σχέση εντόμων - αποικοδομητών και παρόχθιας βλάστησης.....	16
1.1.2. Επιλεκτική διατροφή των υδρόβιων εντόμων – αποικοδομητών.....	16
1.1.3. Προτίμηση των υδρόβιων εντόμων - αποικοδομητών σε μικροβιακά αποικισμένα φύλλα.....	17
1.2. Τα Τριχόπτερα στα υδάτινα οικοσυστήματα.....	18
1.2.1. Οικολογική Σημασία Τριχοπτέρων.....	19
1.2.2. Ενήλικα Τριχοπτέρων.....	20
1.2.3. Προνύμφες Τριχοπτέρων.....	21
1.2.4. Το γένος <i>Micropterna sp</i>	22
1.3. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1. Συλλογή προνυμφών της <i>Micropterna sequax</i>	24
2.2. Είδη φύλλων που δοκιμάστηκαν.....	25
2.3. Πειραματικός σχεδιασμός.....	30
2.3.1. Ρυθμοί κατανάλωσης τροφής προνυμφών της <i>M. Sequax</i>	32
2.3.2. Τροφικές προτιμήσεις προνυμφών της <i>M. Sequax</i>	33
2.4. Χημική ανάλυση φύλλων που δοκιμάστηκαν.....	36
2.5. Έλεγχος σκληρότητας φύλλων που δοκιμάστηκαν.....	44
2.6. Εξέταση φύλλων με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σαρώσεως.....	45
2.7. Στατιστική Ανάλυση.....	46

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
3.1. Αποτελέσματα πειράματος “μη επιλογής”	47
3.2. Αποτελέσματα πειράματος “πολλαπλής επιλογής”	50
3.3. Αποτελέσματα πειράματος “επιλογής κατά ζεύγη”	52
3.3.1. Ζεύγος φύλλων καστανιάς-βελανιδιάς	53
3.3.2. Ζεύγος φύλλων καστανιάς-πλατάνου	55
3.3.3. Ζεύγος φύλλων καστανιάς-οξιάς	57
3.3.4. Ζεύγος φύλλων βελανιδιάς-πλατάνου	59
3.3.5. Ζεύγος φύλλων βελανιδιάς- οξιάς.	61
3.3.6. Ζεύγος φύλλων οξιάς-πλατάνου	63
3.4. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των φύλλων που δοκιμάστηκαν	65
3.5. Αποτελέσματα ελέγχου σκληρότητας των φύλλων που δοκιμάστηκαν	66
3.6. Αποτελέσματα εξέτασης των φύλλων που δοκιμάστηκαν με SEM	67
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
5. Βιβλιογραφία	77
5.1. Ελληνική	77
5.2. Ξένη	77
5.3. Ηλεκτρονική	83
6. Abstract.....	84
7. Παράρτημα	87

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γεγονός, ότι το νερό αποτελεί θεμελιώδη λίθο της ύπαρξης και ανάπτυξης της ζωής στον πλανήτη μας. Είναι απαραίτητο συστατικό όλων των ζωντανών οργανισμών και συμβάλλει σημαντικά στην οικονομική ανάπτυξη, στην κοινωνική ευημερία και στην ποιότητα της ζωής των ανθρώπων. Γενικά, τα υδάτινα οικοσυστήματα προσφέρουν πλήθος αγαθών στον άνθρωπο, όπως νερό για άρδευση, αλιεύματα, βοσκήσιμη ύλη, τόπους για αναψυχή, ενώ παράλληλα έχουν υδροηλεκτρική, πολιτισμική και εκπαιδευτική αξία. Όμως, εντός των υδάτινων οικοσυστημάτων συντελούνται πολλές και σημαντικές διεργασίες, μη ορατές με “γυμνό οφθαλμό”, που συμβάλλουν στην ισορροπία του περιβάλλοντος και την διαίωιση της ζωής.

Ειδικότερα, ένα υδάτινο οικοσύστημα αποτελείται από **αβιοτικούς παράγοντες** όπως το νερό, το έδαφος κ.α. και **βιοτικούς παράγοντες** που είναι οι ζωντανοί οργανισμοί. Η **βιοκοινωνία**, το σύνολο δηλαδή των πληθυσμών των ζωντανών οργανισμών που συνυπάρχουν σε ένα οικοσύστημα καθώς και η αλληλεπίδραση των βιοκοινωνιών με το αβιοτικό περιβάλλον παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον. Έτσι, μέσα από αυτές τις αλληλεπιδράσεις και τις σχέσεις μεταξύ των παραγόντων, αποικοδομείται οργανική ουσία, γίνονται σημαντικές ανταλλαγές ύλης και ενέργειας που μεταφέρεται στις ανώτερες τάξεις της τροφικής αλυσίδας (Λυκάκης, 1996).

Οι ζωντανοί οργανισμοί κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τη θέση τους στη τροφική πυραμίδα: σε παραγωγούς, καταναλωτές και αποικοδομητές.

Παραγωγοί είναι οι οργανισμοί που μετατρέπουν τα ανόργανα υλικά σε οργανικές ενώσεις, τις οποίες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τόσο οι ίδιοι όσο και οι υπόλοιποι ζωντανοί οργανισμοί για τις διάφορες βιολογικές τους λειτουργίες (**αυτότροφοι οργανισμοί**). Η ικανότητα μετατροπής των ανόργανων στοιχείων σε οργανικές ουσίες απαντάται στους οργανισμούς που μπορούν να *φωτοσυνθέτουν* και προϋποθέτει τη χρήση της ηλιακής ενέργειας. Στην κατηγορία των παραγωγών ανήκει επίσης και μια μικρή ομάδα οργανισμών, κυρίως βακτηρίων, οι οποίοι *χημειοσυνθέτουν*, παράγουν δηλαδή την τροφή τους χρησιμοποιώντας την ενέργεια που αποδεδμεύεται από χημικές αντιδράσεις. Τα ζώα κατατάσσονται στην κατηγορία των **καταναλωτών**, γιατί παίρνουν “έτοιμες” οργανικές ενώσεις από τα φυτά, είτε άμεσα, όπως τα φυτοφάγα, είτε έμμεσα, όπως τα σαρκοφάγα ζώα. Τέλος, οι **αποικοδομητές** είναι οργανισμοί οι οποίοι με την βοήθεια ενζύμων αποικοδομούν τη νεκρή οργανική ύλη και αφομοιώνουν τα παράγωγα της αποικοδόμησης. Τόσο οι καταναλωτές, όσο και οι αποικοδομητές είναι **ετερότροφοι οργανισμοί**, επειδή παίρνουν έτοιμες τις οργανικές ενώσεις από άλλους οργανισμούς και δεν τις παρασκευάζουν μόνοι τους, όπως τα φυτά (Βερεσόγλου, 2002).

Επομένως, μέσω της τροφικής διαδικασίας μεταφέρονται και ανταλλάσσονται θρεπτικά υλικά και ενέργεια διαμέσου των ζωντανών οργανισμών. Ειδικότερα στα υδάτινα οικοσυστήματα, κύρια πηγή ενέργειας για τους οργανισμούς που διαβιούν σε αυτά αποτελεί η νεκρή οργανική ύλη που συσσωρεύεται (Vannote *et al.*, 1980). Η αποικοδόμηση της νεκρής οργανικής ύλης είναι μια συνεχής και χρονοβόρος διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν **βιοτικοί** (αποικοδομητές) και **αβιοτικοί** (φυσική φθορά) παράγοντες. Η διαδικασία της αποικοδόμησης της νεκρής οργανικής ουσίας στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει αποτελέσει το αντικείμενο της έρευνας πολλών επιστημονικών εργασιών.

1.1. Ο ρόλος των υδρόβιων εντόμων στην τροφική αλυσίδα

Η μεγάλη ποικιλότητα ενός οικοσυστήματος φαίνεται από την πληθώρα των διαφορετικών ειδών που συναντά κανείς, με τα έντομα (Coleoptera, Hemiptera, Heteroptera κ.λπ.) να αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της ποικιλότητας αυτής. Τα πιο αντιπροσωπευτικά έντομα που συναντώνται στα υδάτινα οικοσυστήματα και τα οποία συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της νεκρής φυτικής οργανικής ύλης, είναι αυτά των τάξεων Ephemeroptera, Plecoptera, Odonata, Diptera και Trichoptera (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Αντιπροσωπευτικά ενήλικα άτομα των τάξεων Ephemeroptera (άνω αριστερά, πηγή: www.palaeos.com), Plecoptera (άνω δεξιά, πηγή: www.charliebrown8989.com) και Odonata (κάτω αριστερά, πηγή: www.emporia.edu), Diptera (κάτω κεντρικά, πηγή: www.papua-insects.nl) και Trichoptera (κάτω δεξιά, φωτ.: Γ. Γεωργούλας)

Τα έντομα αυτά, ανάλογα με τον τρόπο διατροφή τους, μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες (Wallace and Webster, 1996): (α) στα **“αρπακτικά”**, τα οποία λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία απευθείας από τους ιστούς άλλων ζωντανών οργανισμών, (β) στους **“βοσκούς” - “ξύστες”**, οι οποίοι τρέφονται από το βιοφίλμ που καλύπτει τις επιφάνειες φυτικών υπολειμμάτων και πετρωμάτων, (γ) στους **“συλλέκτες”**, οι οποίοι τρέφονται με λεπτά σωματίδια οργανικής ύλης [Fine Particulate Organic Matter – (FPOM)] είτε φιλτράροντας την υδάτινη στήλη, είτε λαμβάνοντας τα απευθείας από το υπόστρωμα, (δ) στους **“τεμαχιστές”**, οι οποίοι διατρέφονται με μεγάλα σωματίδια οργανικής ύλης [Coarse Particulate Organic Matter – (CPOM)] και (ε) στους **“διατηρητές μακρόφυτων”**, οι οποίοι απομυζούν τους χυμούς από ζωντανούς φυτικούς ιστούς.

Όλοι οι παραπάνω οργανισμοί, πλην των αρπακτικών και των διατηρητών, μπορούν και συμπεριφέρονται ως αποικοδομητές της νεκρής οργανικής ύλης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του συνολικού αριθμού των εντόμων - αποικοδομητών και της ποσότητας νεκρής οργανικής ύλης που έχει συσσωρευτεί σε ένα υδάτινο οικοσύστημα (Hildrew *et al.*, 1991: Prochazka *et al.*, 1991: Boulton and Lake, 1992: Friberg, 1997). Αυτή η συσχέτιση, μπορεί να είναι συνέπεια: (α) των υδροδυναμικών παραγόντων που ευθύνονται για την συσσώρευση της οργανικής ύλης, (β) της άμεσης αντίδρασης του πληθυσμού στην αυξομείωση της τροφής και (γ) της αντίδρασης του πληθυσμού στην αύξηση του πληθυσμού των ανταγωνιστών του εντός του υδάτινου οικοσυστήματος.

1.1.1. Σχέση εντόμων - αποικοδομητών και παρόχθιας βλάστησης

Τα φυτά που αναπτύσσονται γύρω από τις όχθες ενός υδάτινου οικοσυστήματος, το εφοδιάζουν συνεχώς με νεκρά φύλλα και τεμάχια νεκρού ξύλου. Αυτά αποτελούν την κυριότερη πηγή τροφής για τα υδρόβια έντομα και συνεπώς την κυριότερη πηγή ενέργειας για το οικοσύστημα (Cummings *et al.*, 1989). Το είδος και η ποσότητα των φύλλων που πέφτουν, επηρεάζουν τόσο τις διατροφικές συνήθειες των εντόμων, όσο και το μέγεθος του πληθυσμού τους. Ειδικότερα, τα έντομα ανάλογα με τις προτιμήσεις τους αποικοδομούν ορισμένα φύλλα ευκολότερα από κάποια άλλα, ενώ οι πληθυσμοί τους μειώνονται όταν παρατηρείται έλλειψη διαθέσιμης τροφής. Η μεγάλη σημασία των υδρόβιων εντόμων για το οικοσύστημα και την τροφική αλυσίδα έγκειται στο ότι αυτά είναι υπεύθυνα για τον κατακερματισμό των νεκρών φύλλων διευκολύνοντας την περαιτέρω αποσύνθεση από άλλους οργανισμούς και την ενσωμάτωση θρεπτικών στοιχείων στην δευτερογενή παραγωγή (Webster and Benfield, 1986). Κατά συνέπεια, η παρακολούθηση των πληθυσμών των υδρόβιων εντόμων και των ρυθμών αποικοδόμησης της οργανικής ύλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για την αειφορική διαχείριση των υδάτινων οικοσυστημάτων.

1.1.2. Επιλεκτική διατροφή των υδρόβιων εντόμων – αποικοδομητών

Σε ένα υδάτινο οικοσύστημα εισέρχονται φύλλα από πολλά και διαφορετικά είδη φυτών με αποτέλεσμα τα έντομα - αποικοδομητές να έχουν πληθώρα επιλογών. Αντίθετα, στο εργαστήριο όταν δίδεται η επιλογή, τα έντομα επιλέγουν να τρέφονται με φύλλα συγκεκριμένων φυτών, ενώ απορρίπτουν άλλα (Nolen and Pearson, 1993: Canhoto and Graca, 1992, 1995: Schulze and Walker, 1997). Τα φύλλα που συνήθως

επιλέγονται φαίνεται να προωθούν την ανάπτυξη, ενώ αυτά που απορρίπτονται εικάζεται ότι αποτελούν πηγές χαμηλής θρεπτικής αξίας (Canhoto and Graca, 1992, 1995). Αυτή η επιλεκτικότητα μπορεί να οφείλεται κυρίως:

(Α) στη **σκληρότητα** των φύλλων, αφού αποτελεί φυσικό εμπόδιο για την διατροφή των εντόμων (Nolen and Pearson, 1993),

(Β) στην **περιεκτικότητα των φύλλων σε θρεπτικές ουσίες ή την απουσία αυτών**, ιδιαίτερα σε αζωτούχες ενώσεις (Walker *et al.*, 1997) και

(Γ) στην **ύπαρξη δευτερευουσών ουσιών** (κυρίως πολυφαινόλες), που συνήθως αποτελούν αμυντικά συστήματα των φυτών και είναι τοξικές ή δύσπεπτες όταν καταναλωθούν (Rosenthal and Jensen, 1979: Waterman and Mole, 1994).

1.1.3. Προτίμηση των υδρόβιων εντόμων - αποικοδομητών σε μικροβιακά αποικισμένα φύλλα

Με τον όρο **μικροβιακά αποικισμένα**, εννοούμε φύλλα στα οποία έχουν εγκατασταθεί κυρίως αποικίες μυκήτων. Διεθνώς, η παραπάνω διαδικασία αποίκησης των φύλλων από μικροοργανισμούς ονομάζεται **conditioning** (Chergui and Pattee, 1991: Graca *et al.*, 1993b: Kiran, 1996). Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που απαντώνται πάνω στην επιφάνεια του φύλλου αυξάνει μόλις αυτά εισέλθουν μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα (Suberkropp *et al.*, 1983). Η αύξηση αυτή αποδίδεται στην αποίκηση των φύλλων από υδρόβιους κυρίως μύκητες που υποβοηθούν την διαδικασία της αποσύνθεσης μέσα στο νερό (Barlocher, 1992: Graca and Ferreira, 1995: Rodrigues and Graca, 1997).

Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι τα υδρόβια έντομα - αποικοδομητές, προτιμούν για την διατροφή τους φύλλα τα οποία έχουν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού. Η προτίμηση αυτή, μπορεί να αποδοθεί στο ότι τα έντομα επωφελούνται από την ύπαρξη των μυκήτων και στο ότι μπορούν να τραφούν από αυτούς (Barlocher and Kendrick, 1975: Graca, 1993). Με το conditioning προάγεται η αποσύνθεση, παράγονται ένζυμα που αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα και απελευθερώνονται θρεπτικά στοιχεία διευκολύνοντας έτσι τη λήψη τους από τα έντομα-αποικοδομητές, ενώ ενδέχεται να έχουν και κάποιο συμβιωτικό ρόλο βοηθώντας στην ευκολότερη πέψη της τροφής τους (Suberkropp *et al.*, 1983: Graca *et al.*, 1993b). Επιπλέον, οι μύκητες πολλές φορές είναι πιο θρεπτικοί, από πλευράς θρεπτικών στοιχείων και επομένως καλύτερη πηγή τροφής για τα έντομα σε σχέση με τα φύλλα. Έχει διαπιστωθεί ότι η διατροφή των υδρόβιων εντόμων αποκλειστικά με φύλλα χωρίς αποικίες μικροοργανισμών, είχε σε ορισμένες περιπτώσεις αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα τους, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε και αύξηση της θνησιμότητας τους (Bueler, 1984: Lawson *et al.*, 1984: Graca *et al.*, 1993b).

1.2. Τα Τριχόπτερα στα υδάτινα οικοσυστήματα

Μία από τις σημαντικότερες τάξεις εντόμων-αποικοδομητών είναι τα Τριχόπτερα. Μετά την τάξη των Διπτέρων, είναι η πολυπληθέστερη τάξη υδρόβιων εντόμων με περίπου 11000 είδη και περισσότερες από 40 οικογένειες ανά τον κόσμο. Είναι ολομετάβολα έντομα, μοιάζουν με τα Λεπιδόπτερα, ενώ πιστεύεται ότι οι πρόγονοί τους ήταν χερσαία είδη (Gullan and Cranston, 2005). Ο ρόλος που διαδραματίζουν στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι πολύ σημαντικός, αφού

αποικοδομούν την οργανική ύλη, τρέφονται με τα νεκρά φύλλα των δασικών δέντρων που πέφτουν και βυθίζονται στο νερό και συμβάλλουν με αυτόν τον τρόπο στην ανακύκλωση και μεταφορά της ενέργειας στα ανώτερα τροφικά επίπεδα. (Vannote *et al.*, 1980; Mandaville, 1999).

1.2.1. Οικολογική σημασία Τριχοπτέρων

Τα Τριχόπτερα, εκτός της σημαντικής τους δράσης ως αποικοδομητές της οργανικής ύλης, θεωρούνται χρήσιμοι δείκτες οργανικής ρύπανσης και χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της κατάστασης της υγείας των υδάτινων οικοσυστημάτων. Ως βιοδείκτες, ορισμένα είδη θεωρούνται ανθεκτικά στη ρύπανση των νερών (Clubb *et al.*, 1975), ενώ άλλα είναι αρκετά ευαίσθητα (Warnick and Bell, 1969). Επίσης, σε συνδυασμό με την παρουσία άλλων υδρόβιων εντόμων, χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της βιοποικιλότητας των υδρόβιων οικοτόπων (Hannaford and Resh, 1995; Hewlett, 2000; de Moor 2002b). Επειδή, οι τροφικές συνήθειες τους ποικίλουν ανάλογα με το είδος και το ηλικιακό στάδιο στο οποίο βρίσκονται, μπορεί να είναι “αρπακτικά”, “βοσκοί-ξύστες”, “τεμαχιστές”, “συλλέκτες οργανικής ύλης”, “διατρητές μακροφύτων” ή συνδυασμός των παραπάνω (Smith, 2005; Σταμόπουλος, 2007). Ως “αρπακτικά” συμβάλλουν στον περιορισμό των πληθυσμών άλλων επιβλαβών προνυμφών και την διατήρησή τους σε χαμηλά επίπεδα (de Moor, 1992), ενώ αποτελούν σημαντικό κρίκο στην τροφική αλυσίδα αφού οι προνύμφες και τα ενήλικα χρησιμοποιούνται ως δολώματα στην αλιεία πέστροφας (McCafferty, 1998).

1.2.2. Ενήλικα Τριχοπτέρων

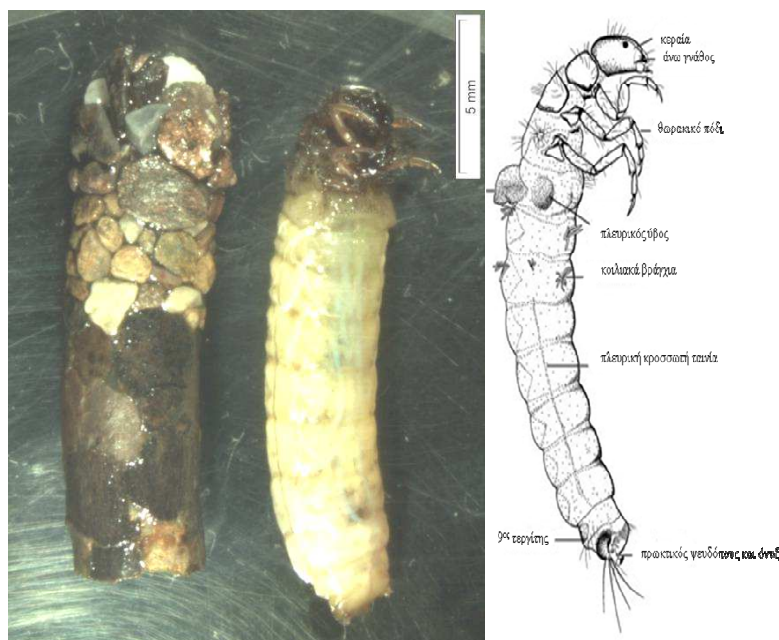
Τα ενήλικα Τριχόπτερα είναι μικρά σε μέγεθος με το μήκος του σώματός τους να ποικίλει από 1,5 mm (Οικ. Hydroptilidae) έως 4 cm (Οικ. Limnephilidae) (Τζανακάκης, 1995: McCafferty, 1998). Έχουν σχετικά ατροφικά στοματικά μόρια στα οποία υπάρχουν χειλικές και γναθικές προσακτρίδες, αλλά απουσιάζουν οι σιαγώνες και τρέφονται ελάχιστα με νερό και νέκταρ (Gullan and Cranston, 2005). Οι σύνθετοι οφθαλμοί είναι καλά ανεπτυγμένοι, ενώ τα οματίδια μερικές φορές απουσιάζουν. Τα μπροστινά φτερά είναι λίγο μεγαλύτερα από τα πίσω και καλύπτονται από κοντό μαλακό τρίχωμα. Σε κατάσταση ηρεμίας τα φτερά είναι διπλωμένα πάνω από το σώμα και σχηματίζουν ένα είδος στέγης. Οι κεραίες είναι νηματοειδείς με μήκος ίσο ή μεγαλύτερο από το μήκος του σώματος (Εικ. 2).



Εικόνα 2: Ενήλικο άτομο της τάξης των Τριχοπτέρων (φωτ.: Γ. Γεωργούλας)

1.2.3. Προνύμφες Τριχοπτέρων

Οι προνύμφες όλων σχεδόν των ειδών είναι υδρόβιες και αναπνέουν με τη βοήθεια κοιλιακών βραγχίων (Smith, 2005: Σταμόπουλος, 2007). Κατά κανόνα, κατασκευάζουν θήκη (κολεό) μέσα στην οποία ζουν και την οποία κουβαλούν μαζί τους όταν μετακινούνται. Η θήκη αυτή δημιουργείται με τη βοήθεια μετάξας που εκκρίνουν από τους σιελογόνους αδένες τους και με διάφορα υλικά (πέτρες, άμμος, ξυλαράκια, φυλλαράκια κ.ά.), τα οποία οι προνύμφες προσκολλούν πάνω τους. Το σχήμα και τα δομικά υλικά της θήκης ποικίλλουν με το είδος του Τριχοπτέρου. Υπάρχουν όμως και προνύμφες που ζουν χωρίς θήκη κάτω από πέτρες ή σε άλλες προστατευμένες θέσεις μέσα στο νερό. Έχουν καλά ανεπτυγμένα στοματικά μόρια μασητικού τύπου, 3 ζευγάρια θωρακικών ποδιών, δε φέρουν κοιλιακούς ψευδόποδες, ενώ έχουν ένα ζευγάρι εδρικών ψευδοπόδων στο τελευταίο κοιλιακό άρθρο που φέρει στο άκρο του ένα 'νύχι' (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Χαρακτηριστικά προνυμφών της τάξης των Τριχοπτέρων (φωτ.: Δ. Σταμόπουλος)

1.2.4. Το γένος *Micropterna*

Το γένος *Micropterna* Stein (1874), ανοίκει στην οικογένεια Limnephilidae και περιλαμβάνει 6 είδη: *M. fissa*, *M. lateralis*, *M. nycterobia*, *M. sequax*, *M. taurica* και *M. testacea*. Τα είδη αυτά συνήθως απαντώνται σε καθαρά και καλά οξυγονωμένα νερά και για αυτό θεωρούνται δείκτες υψηλής καθαρότητας νερών. Τα περισσότερα είδη δρουν ως αποικοδομητές της νεκρής οργανικής ύλης και είναι ευαίσθητα σε χαμηλές τιμές pH (< 4-5) (Σταμόπουλος, 2007).

Το είδος *Micropterna sequax* McLachlan, 1875 (Εικ. 4), απαντάται στα υδάτινα οικοσυστήματα του Πηλίου και γι'αυτό επιλέχθηκε να μελετηθεί στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 4: Ενήλικο *M. sequax* (πηγή: www.commaster.eu)

1.3. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Η παρούσα εργασία εστιάζεται στη δράση και το ρόλο των Τριχοπτέρων ως αποικοδομητών της νεκρής φυτικής οργανικής ύλης εντός ενός υδάτινου οικοσυστήματος. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι ρυθμοί κατανάλωσης τεσσάρων διαφορετικών τροφών από τις προνύμφες είδους *Micropterna sequax*, οι τροφικές προτιμήσεις τους, καθώς και οι παράγοντες που πιθανόν να τις επηρεάζουν.

2. ΥΔΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΩΔΟΙ

2.1. Συλλογή προνυμφών *Micropterna sequax*

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων συλλέχθηκαν προνύμφες της *Micropterna sequax* (Trichoptera: Limnephilidae). Η συλλογή των προνυμφών πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο του 2009 από το ρέμα Κοντόρεμα (Εικ. 5) της περιοχής Καλορίζα του όρους Πήλιον ($39^{\circ} 27' 39''$ Β - $23^{\circ} 01' 09''$ Α, 1015 m υψόμετρο).



Εικόνα 5: Ρέμα Κοντόρεμα, Καλορίζα, όρος Πήλιον (φωτ.: Δ. Σταμόπουλος)

Οι προνύμφες συλλέχθηκαν προσεκτικά με το χέρι και τοποθετήθηκαν σε βάζα γεμάτα νερό από το ρέμα μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Πριν την έναρξη των πειραμάτων οι προνύμφες εγκλιματίστηκαν στις συνθήκες εργαστηρίου για τρεις μέρες. Ο εγκλιματισμός των προνυμφών έγινε μέσα σε ενυδρείο γεμάτο με νερό από το ρέμα συλλογής που οξυγονωνόταν με αντλίες αέρα, ενώ ο πυθμένας του ενυδρείου καλυπτόταν από στρώμα ποταμίσιας άμμου.

Επιπρόσθετα, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο νερό και ποταμίσια άμμος από το ρέμα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα. Στόχος ήταν να προσομοιωθούν όσο το δυνατόν καλύτερα στο εργαστήριο οι πραγματικές συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος των προνυμφών.

2.2. Είδη φύλλων που δοκιμάστηκαν

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν ως τροφή των προνυμφών φύλλα από τα εξής τέσσερα είδη δέντρων:

Βελανιδιά (*Quercus frainetto* - Οικ. Fagaceae), **Οξιά** (*Fagus sylvatica* - Οικ. Fagaceae), **Καστανιά** (*Castanea sativa* - Οικ. Fagaceae) και **Πλάτανος** (*Platanus orientalis* - Οικ. Platanaceae).

Τα παραπάνω είδη δένδρων και φύλλων επιλέχθηκαν επειδή συγκαταλέγονται στην παρόχθια βλάστηση της περιοχής συλλογής των προνυμφών της *M. sequax*, στην οποία κυρίαρχο είδος δένδρου είναι η οξιά.

Η **βελανιδιά** (Εικ. 6) ανήκει στην οικογένεια Fagaceae, η οποία περιλαμβάνει 531 αυτοφυή είδη στο βόρειο ημισφαίριο της γης. Είναι δέντρα ψηλά, αιωνόβια που βρίσκονται είτε σε πεδινές είτε σε ορεινές περιοχές. Το ξύλο όλων των ειδών είναι βαρύ, σκληρό και δεν σαπίζει εύκολα, χρήσιμο στην οικοδομική, ναυπηγική και στην ξυλουργία. Τα φύλλα της είναι δερματώδη, ωσειδή με οξείες παρυφές και χνουδωτά. Ο καρπός της είναι το βελανίδι, χρήσιμο ως ζωοτροφή και στη βυρσοδεψία.



Εικόνα 6: Δέντρο και φύλλα Βελανιδιάς (πηγή: <http://el.wikipedia.org>)

Η **οξιά** ή **φηγός** (Εικ. 7) ανήκει στο γένος *Fagus*, το οποίο περιλαμβάνει δέκα είδη φυλλοβόλων δέντρων που συναντώνται στην Ευρώπη, Ασία και Βόρεια Αμερική. Φυτρώνει σε υψόμετρο από 500 m μέχρι 1800 m. Είναι δέντρο μεγάλο, μέχρι 35 m ύψος, φυλλοβόλο με κορμό ευθύ και κόμη σε νεαρή ηλικία κωνική ενώ όταν το δέντρο γεράσει μετατρέπεται σε πλατιά θολωτή. Στα βουνά της χώρας μας η ζώνη της οξιάς αποτελεί το όριο της δασικής βλάστησης και το κοκκινωπό ξύλο της

χρησιμοποιείται για την κατασκευή επίπλων και εργαλείων. Τα φύλλα της είναι κατ'εναλλαγή δίσειρα, επιμήκη ελλειψοειδή ως αντίστροφα ωοειδή, μήκους 5-15 cm και πλάτους 2,5-8 cm πολύ ή λίγο οξύκορφα. Οι καρποί της είναι κάρνα ανά 2-3 μέσα σε ξυλώδες κύπελλο, που σκεπάζεται από βράκτια.



Εικόνα 7: Δέντρο και φύλλα Οξιάς (πηγή: <http://anthoiamata.blogspot.com>)

Η **καστανιά** (Εικ. 8) ανήκει στην τάξη των Φηγωδών και στην οικογένεια των Φηγοειδών (Fagaceae) με 12 είδη φυλλοβόλων και αιωνόβιων δέντρων. Είναι δέντρα ιθαγενή των εύκρατων περιοχών του βορείου ημισφαιρίου και το ύψος τους μπορεί να φτάσει στα 35 m. Είναι είτε αυτοφυή, είτε καλλιεργούνται για τους νόστιμους καρπούς τους και για την καλής ποιότητας ξυλεία τους. Το ξύλο της είναι σκληρό και ανθεκτικό, σχίζεται εύκολα και δεν προσβάλλεται από μύκητες και έντομα. Τα φύλλα της είναι πριονωτά και μεγάλα. Ο καρπός της, το κάστανο, βρίσκεται μέσα σε ένα ξυλώδες περίβλημα που έχει αγκάθια εξωτερικά και ανοίγει όταν οι καρποί

ωριμάσουν. Ανάλογα με το είδος, μέσα στο περίβλημα υπάρχουν 2-3 καρποί. Οι καστανιές πρέπει να βρίσκονται σε υψόμετρο πάνω από 250 m, διότι δεν ευδοκιμούν σε χαμηλότερα υψόμετρα.



Εικόνα 8: Δέντρο και φύλλα Καστανιάς (πηγή: www.pelion-paths.gr)

Ο **πλάτανος** (Εικ. 9) είναι ιθαγενές δένδρο του βορείου ημισφαιρίου και ανήκει στην οικογένεια των Πλατανοειδών. Η οικογένεια περιλαμβάνει δύο γένη, το *Castanophyllum* με ένα είδος και το *Platanus* που περιλαμβάνει τα περισσότερα είδη. Επίσης έχουν δημιουργηθεί υβριδικά είδη όπως ο πλάτανος του Λονδίνου, ενώ έχουν βρεθεί απολιθώματα πλατάνων ηλικίας 115 εκατομμυρίων χρόνων (Κάτω Κρητιδικό). Πρόκειται για μεγάλα δέντρα, φυλλοβόλα (εκτός από το είδος *P. kerrii*), ταχείας ανάπτυξης με ομπρελοειδή κόμη και ύψος που κυμαίνεται από 30 έως 50 m. Τα φύλλα είναι μεγάλα και πλατιά, με 5 οδοντωτούς λοβούς. Συνήθως συναντώνται

στις όχθες ποταμών και σε υγροτόπους, ενώ μπορούν να επιβιώσουν και στην ξηρασία.



Εικόνα 9: Δέντρο και φύλλα Πλατάνου (φωτ.: www.dkimages.com)

Η συλλογή των φύλλων έγινε το φθινόπωρο του 2008. Επιλέχθηκαν φύλλα πεσμένα στο έδαφος, ακέραια, χωρίς μηχανικές κακώσεις (κοψίματα, τρυπήματα, σχισίματα) και στα οποία δεν υπήρχαν εμφανή συμπτώματα προσβολής από μικροοργανισμούς ή έντομα. Τα φύλλα αφέθηκαν να στεγνώσουν στο εργαστήριο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν μέχρι την έναρξη των πειραμάτων σε θερμοκρασία δωματίου. Δύο εβδομάδες πριν την έναρξη των πειραμάτων, τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε διχτυωτές (άνοιγμα ματιού 500 mm) πλαστικές θήκες και τοποθετήθηκαν σε ένα τοπικό ρέμα προκειμένου να επιτευχθεί ο μικροβιακός τους αποικισμός (conditioning). Οι πλαστικές θήκες επέτρεπαν την επαφή των φύλλων με

το νερό και τους μικροοργανισμούς του, ενώ απέτρεπαν την πρόσβαση των μακροασπόνδυλων σε αυτά (Carvalho and Graça, 2007).

2.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν μέσα σε γυάλινο ενυδρείο διαστάσεων 150 x 60 x 25 cm γεμάτο μέχρι ύψους 12 cm με φιλτραρισμένο (διάμετρος οπής φίλτρου = 400 mesh) ποταμίσιο νερό από το ρέμα Κοντόρεμα. Το νερό οξυγονωνόταν με αντλίες νερού, ενώ με καθημερινή οξυγονομέτρηση ελέγχονταν τα επίπεδα του οξυγόνου στο νερό. Για την ψύξη του νερού και τη διατήρηση της θερμοκρασίας του στα επιθυμητά επίπεδα χρησιμοποιήθηκε συσκευή ψύξης νερού (TECO TR-15, Εικ. 10).

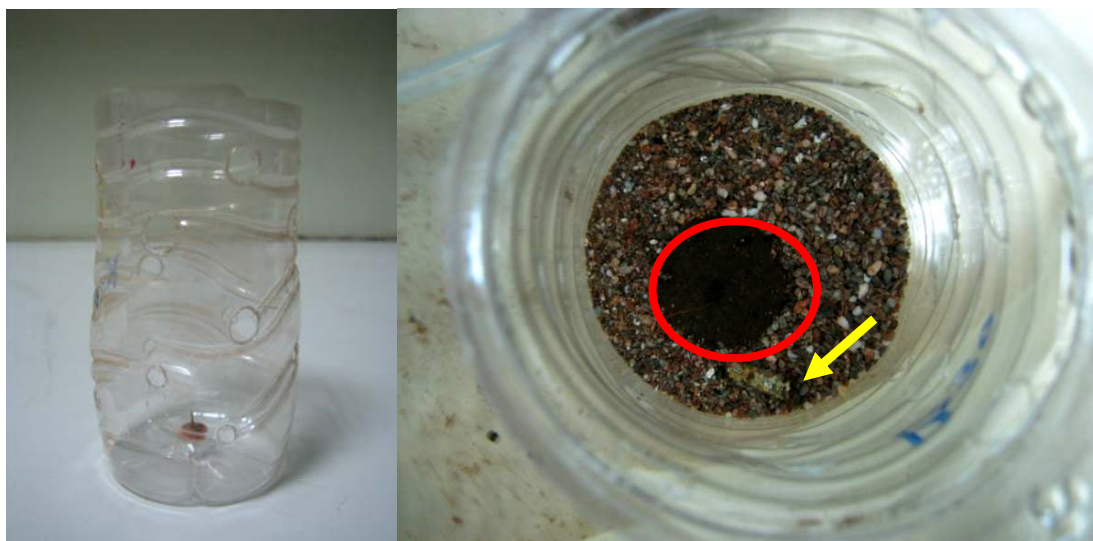


Εικόνα 10: Γυάλινο ενυδρείο, αντλία οξυγόνωσης και συσκευή ψύξης νερού που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (φωτ.: Δ. Σταμόπουλος).

Εντός του ενυδρείου τοποθετήθηκαν διάτρητα πλαστικά δοχεία (ύψους = 15 cm, $\varnothing = 6$ cm) στον πυθμένα των οποίων τοποθετήθηκε στρώμα 30 g ποταμίσιας άμμου (κοκκομετρικής διαμέτρου < 2 mm). Η άμμος πριν την χρησιμοποίηση υπέστη θερμική επεξεργασία για 4 ώρες στους 550°C προκειμένου να απαλλαγεί από τυχόν υπολείμματα οργανικής ουσίας (Carvalho and Graça, 2007).

Τα ελάσματα των φύλλα που προσφέρθηκαν σαν τροφή στις προνύμφες κόπηκαν σε μορφή κυκλικών δισκίων ($\varnothing = 20$ mm), προκειμένου να εξαλειφθούν οποιοσδήποτε ανομοιομορφίες μεταξύ των φύλλων των διαφορετικών ειδών, αλλά και μεταξύ των φύλλων του ίδιου είδους. Τα δισκία των φύλλων στερεώθηκαν στον πυθμένα των δοχείων με τη βοήθεια πινέζας.

Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκε μία προνύμφη της *M. sequax* (Εικ. 11).



Εικόνα 11: Πλαστικό διάτρητο δοχείο που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα και δοχείο με τον πυθμένα του καλυμμένο με άμμο. Διακρίνεται το δισκίο φύλλου που προσφέρονταν ως τροφή και η προνύμφη της *M. sequax* (φωτ.: Γ. Γεωργούλας).

Σε όλα τα πειράματα διατηρήθηκε σταθερή φωτοπερίοδος 12 : 12 ώρες, φως : σκοτάδι, με χαμηλής έντασης τεχνητό φωτισμό (Graça *et al.*, 2001: Ricon and Martinez, 2006). Η θερμοκρασία του νερού και του περιβάλλοντος χώρου καταγράφονταν σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων με αυτόματο καταγραφικό θερμοκρασίας (HOBO H08).

2.3.1. Ρυθμοί κατανάλωσης τροφής προνυμφών *M. sequax*

Για την διερεύνηση του ρυθμού κατανάλωσης των τεσσάρων διαφορετικών τροφών από τις προνύμφες της *M. sequax*, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα σε συνθήκες εργαστηρίου με τις πειραματικές διατάξεις που περιγράφηκαν παραπάνω. Ειδικότερα, οι τροφές που εξετάστηκαν ήταν: (α) φύλλα βελανιδιάς, (β) φύλλα πλατανιού, (γ) φύλλα οξιάς και (δ) φύλλα καστανιάς.

Επιλέχθηκαν 120 προνύμφες της *M. sequax* του ίδιου περίπου μεγέθους, οι οποίες τοποθετήθηκαν μία σε κάθε πλαστικό διάτρητο δοχείο. Υπήρχαν 30 επαναλήψεις για κάθε είδος φύλλου σε πλήρως τυχαιοποιημένη διάταξη εντός του ενυδρείου. Σε κάθε προνύμφη προσφέρθηκε ένα δισκίο ($\varnothing = 20$ mm) ενός από τα τέσσερα είδη φύλλων που εξετάστηκαν, το οποίο αντικαθίστονταν όταν περίπου τα δύο-τρίτα αυτού είχαν φαγωθεί (Εικ. 12). Η θερμοκρασία του νερού στο ενυδρείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν $13 \pm 0,2$ °C, ενώ τα επίπεδα του οξυγόνου στο νερό μετρούνταν σε τακτικά χρονικά διαστήματα και κυμαίνονταν στα $8,5 \pm 0,3$ mg l⁻¹. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 10 ημέρες.

Μετά το τέλος του πειράματος τα υπολείμματα των φύλλων τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 48 ώρες στους 60 °C και ζυγίστηκαν, προκειμένου να υπολογιστεί η

τελική ξηρή μάζα τους. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ολική κατανάλωση (mg), ως ημερήσια κατανάλωση τροφής (mg d^{-1}) και ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης ($\text{mg d}^{-1} \text{mg}_\pi^{-1}$).



Εικόνα 12: Πειραματική διάταξη και δισκίο φύλλου βελανιδιάς φαγωμένο από προνύμφες της *M. sequax* (φωτ.: Δ. Σταμόπουλος).

2.3.2. Τροφικές προτιμήσεις προνυμφών της *M. sequax*

Στη βιβλιογραφία είναι έντονος ο προβληματισμός στα πειράματα για τη μελέτη των τροφικών προτιμήσεων των μακροσπόνδυλων, όσο αναφορά για το πώς πρέπει να δίνεται αυτή η δυνατότητα επιλογής στους υπό εξέταση οργανισμούς. Δηλαδή, αν θα πρέπει να διαλέγουν μόνο μεταξύ δύο ή περισσότερων ή ενδεχομένως μεταξύ όλων των διαφορετικών τροφών ταυτόχρονα (Canhoto *et al.*, 2005). Αναφέρεται ότι υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα πειραμάτων πολλαπλής επιλογής δεν συνέπιπταν απαραίτητα με αυτά των πειραμάτων που έγιναν με επιλογή κατά ζεύγος (Manly, 1993). Για το λόγο αυτό, κατά το σχεδιασμό της παρούσας μελέτης κρίθηκε σκόπιμο ο έλεγχος των τροφικών προτιμήσεων των

προνυμφών της *M. sequax* να γίνει και με τις δύο παρακάτω μεθόδους: στην 1^η οι προνύμφες είχαν να επιλέξουν ανάμεσα και στα τέσσερα είδη φύλλων (πείραμα πολλαπλής επιλογής), ενώ στη 2^η οι προνύμφες είχαν να επιλέξουν ανάμεσα σε δύο είδη φύλλων κάθε φορά, από τα τέσσερα που δοκιμάστηκαν (πείραμα επιλογής κατά ζεύγη).

Ο πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήθηκε ήταν ο ίδιος με αυτόν που περιγράφηκε στο προηγούμενο πείραμα. Ειδικότερα, στο πείραμα της **πολλαπλής επιλογής** επιλέχθηκαν 30 προνύμφες της *M. sequax* του ίδιου περίπου μεγέθους, οι οποίες τοποθετήθηκαν ανα μία σε κάθε πλαστικό διάτρητο δοχείο, εντός του οποίου υπήρχαν τέσσερα δισκία ($\varnothing = 20$ mm) από κάθε ένα από τα τέσσερα είδη φύλλων που εξετάστηκαν (Σχ. 1)



Σχήμα 1: Διάταξη δισκίων φύλλων εντός του πλαστικού δοχείου στο πείραμα πολλαπλής επιλογής.

Στο πείραμα της **επιλογής κατά ζεύγη** επιλέχθηκαν 120 προνύμφες της *M. sequax* του ίδιου περίπου μεγέθους, οι οποίες τοποθετήθηκαν ανά μία σε κάθε πλαστικό διάτρητο δοχείο. Σε κάθε προνύμφη προσφέρθηκαν δύο δισκία φύλλων ($\varnothing = 20$ mm) από τα τέσσερα είδη που δοκιμάστηκαν με τους εξής συνδυασμούς: καστανιά-βελανιδιά, καστανιά-πλατάνι, καστανιά-οξιά, βελανιδιά-πλατάνι, βελανιδιά-οξιά και οξιά-πλατάνι. Πραγματοποιήθηκαν 20 επαναλήψεις για κάθε έναν από τους έξι συνδυασμούς φύλλων που εξετάστηκαν, σε πλήρως τυχαιοποιημένη διάταξη εντός του ενυδρείου (Σχ. 2).



Σχήμα 2: Διάταξη δισκίων φύλλων εντός του πλαστικού δοχείου στα πειράματα επιλογής κατά ζεύγη.

Και στις δυο περιπτώσεις, τα δισκία των φύλλων αντικαθιστούνταν όταν περίπου τα 2/3 του δισκίου είχε φαγωθεί. Η θερμοκρασία του νερού στο ενυδρείο ήταν $13 \pm 0,2$ °C, ενώ τα επίπεδα του οξυγόνου στο νερό που μετρούνταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν $8,5 \pm 0,3$ mg l⁻¹. Τα πειράματα διήρκησαν 10 ημέρες.

Μετά το τέλος των πειραμάτων τα υπολείμματα των φύλλων τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 48 ώρες στους 60 °C και ζυγίστηκαν προκειμένου να υπολογιστεί η τελική ξηρή μάζα των φύλλων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ολική κατανάλωση (mg), ως ημερήσια κατανάλωση τροφής (mg d⁻¹) και ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d⁻¹ mg_π⁻¹).

2.4. Χημική ανάλυση φύλλων που δοκιμάστηκαν

Προκειμένου να διερευνηθούν περαιτέρω πιθανά αίτια στα οποία είναι δυνατόν να οφείλεται η προτίμηση ή μη ενός θρεπτικού υποστρώματος από τις προνύμφες της *M. sequax*, έγινε μια πρώτη προσπάθεια προσέγγισης του θέματος όσο αναφορά τον υπολογισμό των θρεπτικών στοιχείων (κυρίως πρωτεΐνες), των βασικών ανόργανων ιόντων και του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των τεσσάρων διαφορετικών φύλλων που δοκιμάστηκαν ως τροφικό υπόστρωμα, στα παραπάνω πειράματα.

A) Προσδιορισμός Ολικών Αζωτούχων Ουσιών-Μέθοδος KJELDAHL

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού του οργανικώς δεσμευμένου αζώτου (N%) κατά Kjeldahl και από τη συγκέντρωσή του υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνες με τη βοήθεια της σχέσης: **Πρωτεΐνη % = N % x 6,25** (όπου 6,25 ο γενικός συντελεστής

μετατροπής του οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνες). Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν ειδικές συσκευές απόσταξης και καύσης της εταιρίας BEHR Labor Technik GmbH, ενώ η συσκευή καύσης αποτελούνταν από τη μονάδα Inkjel, η οποία ήταν αναγκαία για τη δέσμευση και εξουδετέρωση των τοξικών αερίων που σχηματίζονται κατά την υγρή καύση των δειγμάτων.

Το πρωτόκολλο της μεθόδου Kjeldahl που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

i) Προετοιμασία δειγμάτων: Δείγμα από τα τέσσερα είδη φύλλων που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφές για τα πειράματα αλέσθηκαν και 0,2 g αλεσμένου δείγματος του κάθε είδους τοποθετήθηκαν σε φιάλες βρασμού, μαζί με δύο ταμπλέτες καταλύτη Kjeldahl (Kjeltabs CX, Gerhardt GmbH) και 15ml πυκνού H_2SO_4 σε κάθε φιάλη.

ii) Πέψη: Οι φιάλες αρχικά τοποθετήθηκαν σε ειδική βάση, στη συνέχεια κλείστηκαν με ειδικά πώματα με υποδοχές αναρρόφησης των επικίνδυνων αερίων και ακολούθως τοποθετήθηκαν στη θέση βρασμού της συσκευής πέψης. Εντός της συσκευής παρέμειναν τα δείγματα για 85 min σε 3 στάδια: το 1^ο είχε διάρκεια 5 min (100 % Power), το 2^ο είχε διάρκεια 20 min (55 % Power) και το 3^ο είχε διάρκεια 60 min (90 % Power).

Στο τέλος, οι φιάλες παρέμειναν εντός της συσκευής, στη θέση ψύξης για 20-30 min.

iii) Απόσταξη – Τιτλοδότηση: Στην συσκευή απόσταξης τοποθετήθηκαν μία φιάλη του δείγματος μας στην ειδική θέση της και μια άδεια κωνική φιάλη στην οποία είχε προστεθεί ο κατάλληλος δείκτης, για την υποδοχή του απεσταγμένου δείγματος. Η συσκευή με το κατάλληλο πρόγραμμα, πρόσθετε 100 ml H_2O και 80 ml NaOH στη φιάλη του δείγματος και 50 ml H_2BO_3 στην κωνική φιάλη με το δείκτη. Στη συνέχεια

θέρμαινε το δείγμα και απόσταξε τα αέρια του στην κωνική φιάλη, μαζί με το βορικό οξύ και την δεσμευμένη αμμωνία.

Στη συνέχεια, η κωνική φιάλη με το περιεχόμενο της τοποθετούνταν στον ειδικό ηλεκτρονικό δοσομετρητή τιτλοδότησης. Αφού, μηδενιζόταν ο μετρητής, προσθέτονταν με αργό ρυθμό δεκατοκανονικό διάλυμα (0,1N) HCl, μέχρι να αλλάξει το χρώμα του διαλύματος. Η ένδειξη με τα ml που προστέθηκαν καταγράφονταν και χρησιμοποιήθηκαν στους υπολογισμούς.

iv) Υπολογισμοί: Οι κύριες χημικές αντιδράσεις που συντελέστηκαν ήταν:

- Πέψη: Οργανικό N + H₂SO₄ → (NH₄)₂SO₄ + H₂O + CO₂ + λοιπά
- Απόσταξη: (NH₄)₂SO₄ + 2 NaOH → Na₂SO₄ + 2 NH₃ + 2 H₂O
- Τιτλοδότηση (με 0,1 HCl): NH₃ + H₃BO₃ → {NH₄⁺:H₂BO₃⁻} + H₃BO₃



➤ Η περιεκτικότητα του δείγματος μας σε N % υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$N\% = (ml\ HCl - ml\ Μάρτυρα) \cdot 0,14007 / Βάρος\ Δείγματος\ (g)$$

➤ Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνες υπολογίστηκε με τη βοήθεια της σχέσης: **Πρωτεΐνες % = N % x 6,25**, όπου 6,25 ο γενικός συντελεστής μετατροπής σε πρωτεΐνες του οργανικού αζώτου.

B) Προσδιορισμός Βασικών Ανόργανων Ιόντων-Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ορισμένων βασικών ανόργανων ιόντων των τεσσάρων διαφορετικών φύλλων που δοκιμάστηκαν ως τροφικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Με την τεχνική της HPLC επιτυγχάνουμε το διαχωρισμό των συστατικών ενός υγρού μίγματος, περνώντας το μέσα από μια χρωματογραφική στήλη, με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης. Στην HPLC διακρίνουμε δυο φάσεις: α) τη στατική φάση, που αποτελείται από στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη και β) την κινητή φάση που είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης και έτσι επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά. Η μέθοδος HPLC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό και την ανάλυση μιγμάτων μοριακών ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αποτελείται από έξι τμήματα: α) το σύστημα της αντλίας (pump), β) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (injector valve), γ) τη στήλη και προστήλη (column-precolumn), δ) τον ανιχνευτή (detector), ε) το καταγραφικό-ολοκληρωτή και στ) τον ηλεκτρονικό υπολογιστή και τον εκτυπωτή.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία έγινε μια πρώτη προσπάθεια προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ιόντων καλίου (K^+), μαγνησίου (Mg^+), ασβεστίου (Ca^+), χλωρίου (Cl^-), νιτρικών (NO_3^-), θεικών (SO_4^{2-}) και φωσφορικών (PO_4^{3-}) στα φύλλα βελανιδιάς, πλατανιού, οξιάς και καστανιάς.

Το πρωτόκολλο της μεθόδου χημικής ανάλυσης των φύλλων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

i) Προετοιμασία δειγμάτων: Οι φυτικοί ιστοί καθαρίστηκαν προσεκτικά από ξένες ουσίες (χώμα, σκόνη, υπολείμματα διαφυλλικών ψεκασμών), χωρίς να εκπλυθούν τα υδατοδιαλυτά στοιχεία (N, B, K) ή να αλλοιωθεί η ακεραιότητα τους. Στη συνέχεια, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε κλίβανο για 24 ώρες σε θερμοκρασία $110\text{ }^\circ\text{C}$ και ακολούθως αλέσθηκαν (μέγεθος σωματιδίων 0,5 - 1,0 mm) προκειμένου να ομογενοποιηθεί το δείγμα.

ii) Ανάλυση προσδιορισμού ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ:

1. Ξηρή και Υγρή Καύση: Ποσότητα 1 g αλεσμένου και πλήρως ομογενοποιημένου φυτικού ιστού μεταφέρθηκε με πυρίμαχες κάψες σε φούρνο, όπου και παρέμεινε για 4 ώρες στους $400\text{ }^\circ\text{C}$, προκειμένου να γίνει η ξηρά καύση και να παραμείνει στο τέλος μια καθαρή, λευκή στάχτη (πλήρης οξείδωση της οργανικής ουσίας). Μόλις οι κάψες κρύωσαν, ξεκινήσε η υγρή καύση. Αρχικά, προστέθηκε 1 ml HCl και 5 ml $H_2O_{Υπερκαθ}$ σε κάθε κάψα και το περιεχόμενο τους μεταφέρθηκε σε ποτήρια ζέσεως των 50 ml. Ακολούθως, εκπλύθηκαν οι κάψες με 5 ml υπερκάθαρο H_2O . Το έκπλυμα των καψών επαναλήφθηκε, ενώ το περιεχόμενο τους μεταφέρθηκε και αυτό στα ποτήρια ζέσεως. Τα ποτήρια ζέσεως τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους $90\text{ }^\circ\text{C}$ για 30 min. Το περιεχόμενο των ποτηριών ζέσεως αδειάστηκε σε

ογκομετρικούς κυλίνδρους των 50 ml, με τον τελικό όγκο των διαλυμάτων να ήταν στα 20 ml. Τα δείγματα ήταν έτοιμα προς ανάλυση.

2. Προετοιμασία Χρωματογράφου (HPLC): Για την προετοιμασία του χρωματογράφου Alltech (526 HPLC Pump, ERIS 1000HP Autosuppressor) έγιναν οι απαραίτητοι έλεγχοι (συνδεσμολογία, επιθυμητή πίεση), επιλέχθηκε η κατάλληλη στήλη για τον προσδιορισμό κατιόντων (Universal Cation 7u), ενώ για τη διαδικασία της κινητής φάσης διαλύθηκαν 0.1945 ml methanosulfonic acid (με τη σύριγγα ακριβείας) σε 1 L υπερκάθαρο H₂O.

3. Ανάλυση Δειγμάτων: Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κατιόντων του διαλύματος των δειγμάτων φυτικού ιστού ήταν 1:200 (0.1 ml διαλύματος σε 19.9 ml H₂O_{Υπερκαθ.}) και από τα χρωματογραφήματα τους προσδιορίστηκαν τα κατιόντα.

ii) Ανάλυση προσδιορισμού ANIONΤΩΝ:

1. Εκχύλιση Ανιόντων: Ποσότητα 1 g αλεσμένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 ml, στις οποίες προστέθηκαν 20 ml διαλύματος μεθανόλη : υπερκάθαρο H₂O (1:1, v:v) και αναδεύτηκαν για 30 min στις 150 rpm. Στη συνέχεια, το αιώρημα διηθήθηκε μέσα από φίλτρο (Whatman – 90 mm) ώστε να εκχυλιστούν τα ανιόντα μέσα σε ογκομετρικούς σωλήνες των 50 ml και συμπληρώθηκε H₂O_{Υπερκαθ.} μέχρι τα δείγματα να φτάσουν στα 30 ml. Τα δείγματα ήταν έτοιμα προς ανάλυση.

2. Προετοιμασία Χρωματογράφου (HPLC): Για τον προσδιορισμό των ανιόντων χρησιμοποιήθηκε η κατάλληλη στήλη (Allsep Anion 7u), ενώ για την

προετοιμασία της κινητής φάσης διαλύθηκαν 0.0954 g Sodium Carbonate και 0.0714 g Sodium Bicarbonate (ζύγισμα με ζυγαριά ακριβείας) σε 1 L υπερκάθαρο H₂O.

3. Ανάλυση Δείγματος: Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανιόντων του διαλύματος των δειγμάτων φυτικού ιστού ήταν 1:60 (0,2 ml διαλύματος σε 11,8 ml H₂O_{Υπερκαθ.}) και από τα χρωματογραφήματα τους προσδιορίστηκαν τα ανιόντα.

Γ) Προσδιορισμός Συνολικού Φαινολικού Περιχομένου - Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Με την χρωματομετρική, οξειδοαναγωγική αντίδραση Folin-Ciocalteu είναι δυνατός ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιχομένου, χωρίς τον διαχωρισμό μεταξύ των μονομερών, διμερών και ανωτέρων φαινολικών συστατικών. Το Folin-Ciocalteu είναι μείγμα μολυβδαινικού νατρίου (Na₂MoO₄), βολφραμικού νατρίου (Na₂WO₄) και φωσφορικού οξέως (H₃PO₄) το οποίο προκαλεί οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης του Folin-Ciocalteu με τα φαινολικά συστατικά είναι ένα σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμιδίου χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά το ορατό φώς (760nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διέλυμα Na₂CO₃.

i) Προετοιμασία δειγμάτων: Φύλλα από τα τέσσερα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφές για τα πειράματα αφέθηκαν να στεγνώσουν στο εργαστήριο για 3 ημέρες και στη συνέχεια αλέσθηκαν και κοσκινίστικαν (Ø = 1 mm). Για κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 0,5 g και μαζί με 5 ml ακετόνης τοποθετήθηκαν σε κλειστά φιαλίδια προκειμένου να μην εξατμιστεί το περιεχόμενο. Τα φιαλίδια αυτά τοποθετήθηκαν για 2 ώρες σε ειδικό αναδευτήρα προκειμένου να ομογενοποιηθεί το

διάλυμα και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν (Hettich, Universal) για 5 min στις 4000 στροφές προκειμένου να διαχωριστούν τα υγρά από τα στερεά συστατικά. Το υπερκείμενο υγρό κάθε φιαλιδίου εξάχθηκε και τοποθετήθηκε σε νέο, ενώ στο ίζημα που παρέμεινε τοποθετήθηκαν εκ νέου 5 ml ακετόνης και επαναλήφθηκε η διαδικασία εξαγωγής. Ο όγκος του τελικού υγρού δείγματος μετά τις δύο εξαγωγές ήταν 10 ml. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε ένα από τα τέσσερα είδη φύλλων.

Επίσης παρασκευάστηκαν: (α) αραιό διάλυμα Folin-Ciocalteu (25 ml FC εμπορίου σε 225 ml απιονισμένο H_2O , 1:10), (β) διάλυμα Na_2CO_3 (75 g άνυδρο Na_2CO_3 σε 925 ml απιονισμένο H_2O) και (γ) διάλυμα γαλλικού οξέως (0,5 g ξηρό γαλλικό οξύ σε 100 ml απιονισμένο H_2O) σε 5 διαφορετικές αραιώσεις με τελική συγκέντρωση 2,5-5-7,5-10-15 mg % προκειμένου να δημιουργήσουμε την πρότυπη καμπύλη.

ii) Ανάλυση: Σε 18 ml απιονισμένο H_2O προσθέσαμε 2 ml από το τελικό δείγμα (αραίωση 1:10). Σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέραμε 2 ml από το αραιωμένο διάλυμα μαζί με 10 ml αραιού διαλύματος FC και το ανακατέχαμε σε αναδευτήρα (Vortex). Στη συνέχεια στον ίδιο σωλήνα προσθέσαμε 8 ml διαλύματος Na_2CO_3 και το ανακατέψαμε πάλι σε Vortex. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, αλλά αντί για το δείγμα προστέθηκαν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέως και συμπληρώθηκαν με απιονισμένο H_2O . Επίσης δημιουργήθηκε και ένα δείγμα-μάρτυρας μόνο με απιονισμένο H_2O . Η φασματοφωτομέτρηση (Milton Roy, Spectronic 301) πραγματοποιήθηκε στα 760 nm. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέως (GAE) ανά g ξηρού βάρους φύλλου.

2.5. Έλεγχος σκληρότητας φύλλων που δοκιμάστηκαν

Προκειμένου να διερευνηθούν ακόμη περισσότερο τα αίτια στα οποία πιθανόν να οφείλονται οι διαφορετικοί ρυθμοί κατανάλωσης των τροφών και οι προτιμήσεις των προνύμφών της *M. sequax* στα συγκεκριμένα φύλλα που τους προσφέρθηκαν, κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθούν μετρήσεις που αφορούσαν την σκληρότητα των φύλλων αυτών. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες που αναφέρουν ότι μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν τις διατροφικές συνήθειες των εντόμων-αποικοδομητών είναι και η σκληρότητα του τροφικού υποστρώματος (Graça, 2001), ενώ οι Nolen και Pearson (1993) αναφέρουν ότι νεαρές προνύμφες της *Anisocentropus kirramus* (Trichoptera: Calamoceratidae) δεν μπόρεσαν να τραφούν με τα σκληρότερα φύλλα (*Litsea leefeana*), από τα 5 είδη που δοκιμάστηκαν (*Litsea leefeana*, *Cryptocarya densiflora*, *Syzigium papyraceum*, *Cryptocarya hypoglauca*, *Freycinetia scandens*).

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία για να μετρηθεί η σκληρότητα των τεσσάρων φύλλων που δοκιμάστηκαν, μετρήθηκε η δύναμη Newton που προκαλούσε τη θραύση των ελασμάτων των διαφορετικών φύλλων. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ειδικό δυναμόμετρο (Admet Interface SM-250) το οποίο πίεζε το κάθε δείγμα με έμβολο (διαμέτρου = 2 mm) μέχρι να προκαλέσει τη θραύση του. Το δυναμόμετρο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και μέσω του προγράμματος WinCom Plus καταγράφονταν οι μέγιστες τιμές δύναμης που ασκήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Πραγματοποιήθηκαν 50 επαναλήψεις για κάθε ένα από τα τέσσερα διαφορετικά είδη φύλλων που δοκιμάστηκαν και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε δύναμη Newton.

2.6. Εξέταση φύλλων με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σαρώσεως

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή της παρούσας μελέτης, πολλοί ερευνητές έχουν επισημάνει το σημαντικό ρόλο που φαίνεται να επιτελεί ο μικροβιακός αποικισμός στις διατροφικές συνήθειες των εντόμων-αποικοδομητών (Barlocher και Kendrick, 1975: Suberkropp *et al.*, 1983: Bueler, 1984: Lawson *et al.*, 1984: Graça, 1993). Για τον λόγο αυτό και προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη μικροβιακού αποικισμού (conditioning) στα φύλλα που προσφέρθηκαν στις προνύμφες, κρίθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η επιφάνεια των φύλλων με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σαρώσεως (Scanning Electron Microscope, SEM). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα φύλλα βελανιδιάς, πλατάνου, οξιάς και καστανιάς που είχαν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού και συγκρίθηκαν με φύλλα που δεν είχαν υποβληθεί στην ίδια διαδικασία. Οι παρατηρήσεις έγιναν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως τύπου Cambridge Stereoscan 240.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρειαζόταν μεγάλη προσοχή κατά τις εμβάπτισεις, ώστε να μην αποκολληθεί το επιφανειακό στρώμα των φύλλων στο οποίο αναπτύσσονται οι μικροβιακές αποικίες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Εμβάπτιση φύλλων σε Φορμόλη 10 % για περίπου 10-12 ώρες.
2. Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό (δύο φορές).
3. Εμβάπτιση σε 50 % Alcohol για 10 min.
4. Εμβάπτιση σε 70 % Alcohol για 10 min.
5. Εμβάπτιση σε 80 % Alcohol για 10 min.
6. Εμβάπτιση σε 95 % Alcohol για 10 min (δύο φορές).
7. Εμβάπτιση σε 100 % Alcohol για 10 min (δύο φορές).

8. Εμβάπτιση σε 100 % Acetone για 10 min.
9. Air Drying και Critical Point Dryer.
10. Επιμετάλλωση Χρυσού (25mA, 45 sec).

2.7. Στατιστική Ανάλυση

Οι μετρήσεις των πειραμάτων εκφράστηκαν ως ολική κατανάλωση (mg), ως ημερήσια κατανάλωση τροφής (mg d^{-1}) και ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης ($\text{mg d}^{-1} \text{mg}_p^{-1}$). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 13 για Windows. Επειδή οι τιμές των δεδομένων δεν ικανοποιούσαν όλες τις προϋποθέσεις για την παραμετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων (δεν είχαν ίση παραλλακτικότητα), χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της διακύμανσης το μη παραμετρικό τεστ των Kruskal-Wallis και το στατιστικό κριτήριο Mann-Whitney σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$. Επίσης, επειδή κατά τη διάρκεια των πειραμάτων υπήρχαν απώλειες λόγω θνησιμότητας και λόγω νύμφωσης των προνυμφών, η συζήτηση που ακολουθεί επικεντρώθηκε περισσότερο στις τιμές των ημερησίων καταναλώσεων τροφής (mg d^{-1}) από τις προνύμφες, προκειμένου να είναι πιο αξιόπιστα τα συμπεράσματα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα πειράματος “μη επιλογής”

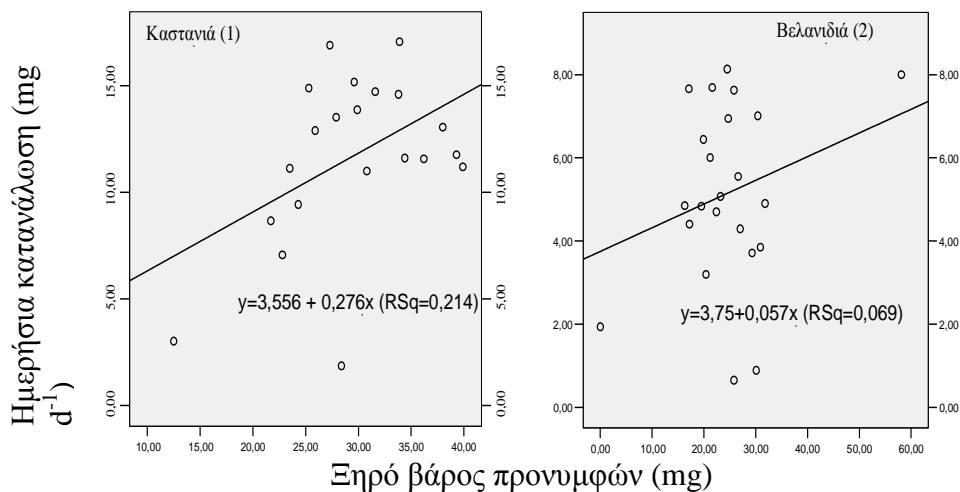
Τα αποτελέσματα του πειράματος, όπου στις προνύμφες της *M. sequax* προσφέρθηκε τροφή αποκλειστικά από ένα είδος φύλλων, έδειξαν ότι το είδος και η ποιότητα της τροφής επηρεάζει το ρυθμό κατανάλωσης των προνυμφών, ενώ κατά τη διάρκειά του παρατηρήθηκε το φαινόμενο της νύμφωσης ενός ποσοστού των προνυμφών. Σε όλα τα αποτελέσματα, είτε αυτά εκφράστηκαν ως ημερήσια κατανάλωση τροφής (mg d^{-1}), είτε ως ολική κατανάλωση (mg), είτε ως ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης ($\text{mg d}^{-1} \text{mg}^{-1}$) υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταναλώσεων φύλλων καστανιάς, βελανιδιάς, πλατάνου και οξιάς (Πίν. 1). Όπως προαναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα αποτελέσματα των ημερήσιων καταναλώσεων τροφής είναι πιο αντιπροσωπευτικά και σε αυτά επικεντρωθήκαμε περισσότερο, ενώ φαίνεται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού ημερήσιας κατανάλωσης των διαφορετικών φύλλων και του ξηρού βάρους των προνυμφών, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι οι προνύμφες που επιλέχθηκαν ήταν σχεδόν ισοβαρείς (Σχ. 3-6). Αναλυτικότερα, ο μεγαλύτερος ημερήσιος ρυθμός κατανάλωσης τροφής καταγράφηκε για την καστανιά και ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερος από τους ρυθμούς κατανάλωσης που μετρήθηκαν για τη βελανιδιά, το πλατάνι και την οξιά, ενώ τα ποσοστά νύμφωσης που καταγράφηκαν ήταν διαφορετικά σε κάθε μία από τις τέσσερις περιπτώσεις διατροφής. Το χαμηλότερο ποσοστό νύμφωσης παρατηρήθηκε στην περίπτωση της

διατροφής με φύλλα καστανιάς, ενώ το υψηλότερο στην περίπτωση της διατροφής με φύλλα οξιάς (Σχ. 7). Η θνησιμότητα των προνυμφών ήταν μηδενική για όλες τις περιπτώσεις των φύλλων που εξετάστηκαν, εκτός από την περίπτωση της καστανιάς, όπου στο τέλος του πειράματος καταγράφηκε θνησιμότητα της τάξης του 6,7 %.

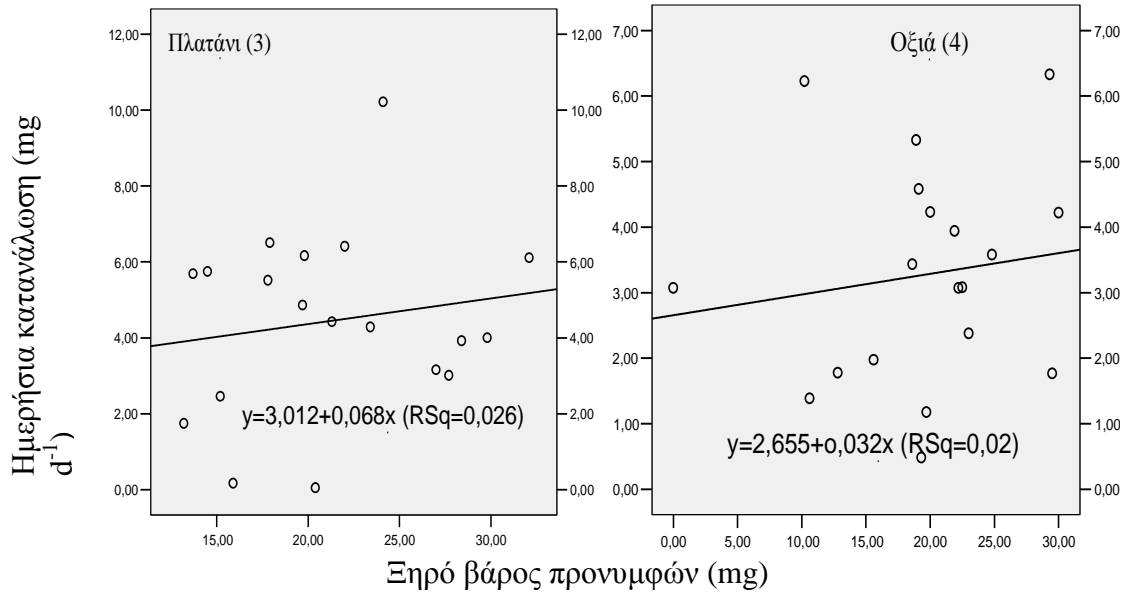
Πίνακας 1: Καταναλώσεις φύλλων καστανιάς, βελανιδιάς, πλατανιού και οξιάς από τις προνυμφές της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο, στο πείραμα ‘μη επιλογής’ (n=30).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d ⁻¹)	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d ⁻¹ mg ⁻¹)	Ποσοστό νύμφωσης (%)	Ποσοστό θνησιμότητας (%)
Καστανιά	9,8 ± 1,1 a	101,2 ± 10,2 a	0,39 ± 0,03 b	21,4	6,7
Βελανιδιά	4,9 ± 0,4 b	47,5 ± 4,2 b	0,22 ± 0,02 b	28,4	0
Πλατάνι	3,9 ± 0,4 b	37,7 ± 4,3 b	0,21 ± 0,03 b	34,1	0
Οξιά	2,7 ± 0,3 c	25,4 ± 3,1 c	0,17 ± 0,03 c	40,0	0

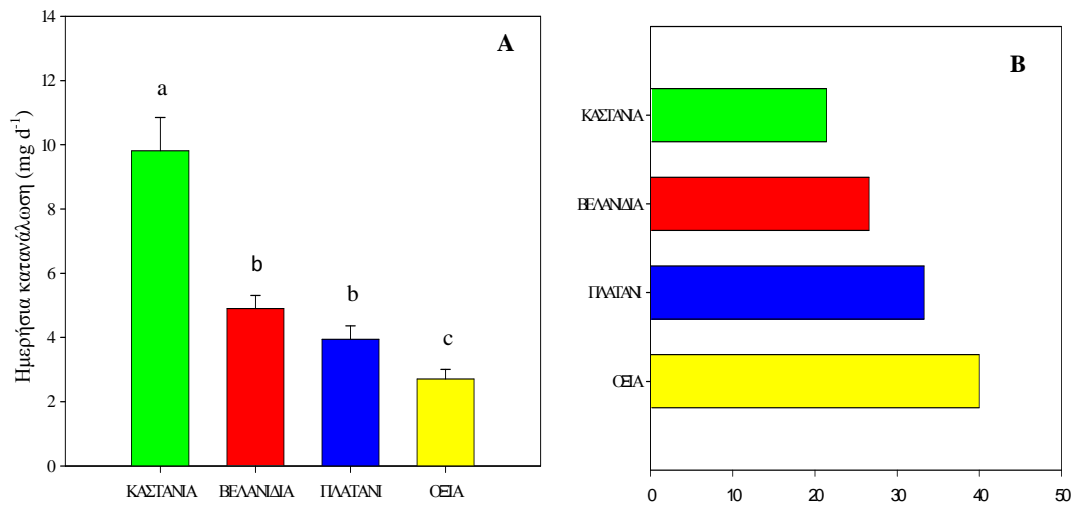
Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 3-4: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων καστανιάς (1), βελανιδιάς (2) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήματα 5-6: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων πλατάνου (3), οξιάς (4) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήμα 7: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d⁻¹) και (B) ποσοστά νύμφωσης (%) των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα καστανιάς, βελανιδιάς, πλατανιού και οξιάς στο πείραμα “μη επιλογής” (n=30).

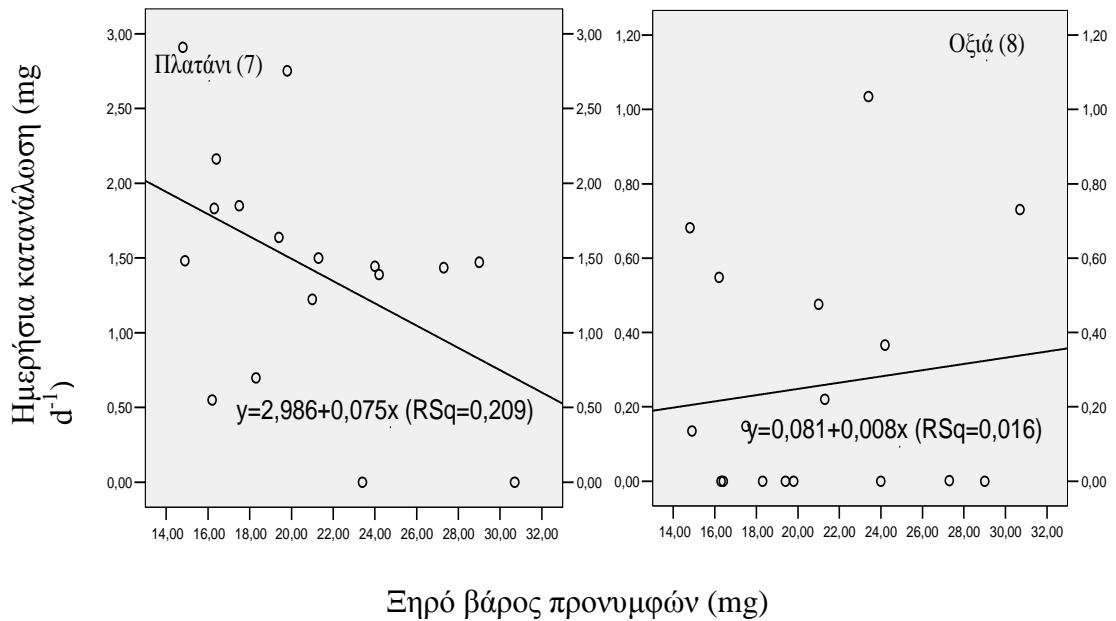
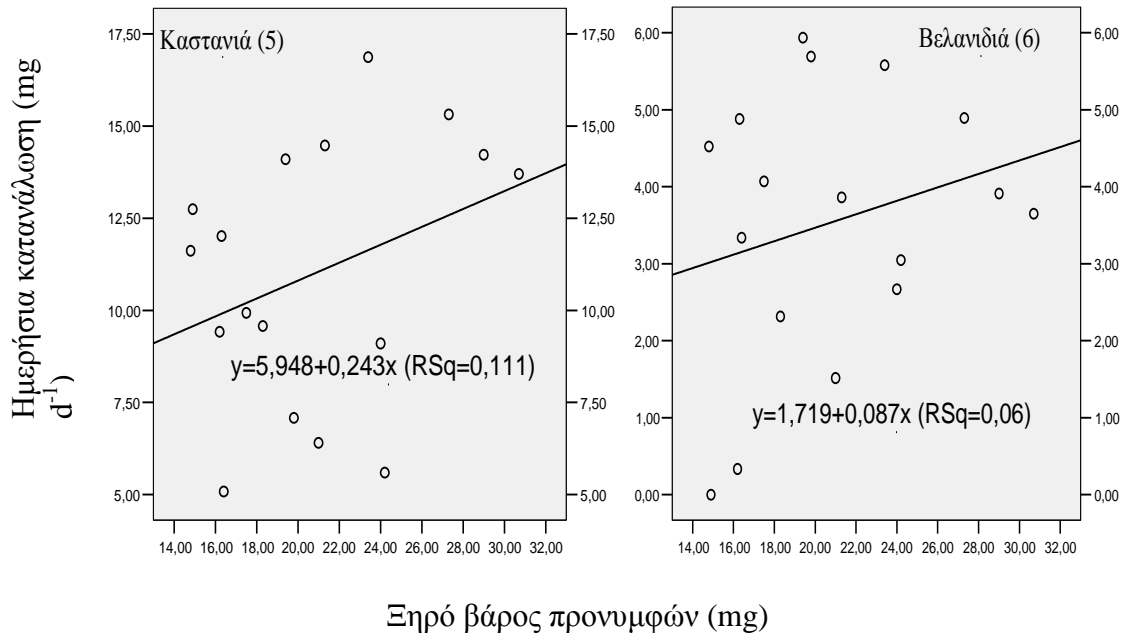
3.2. Αποτελέσματα πειράματος “πολλαπλής επιλογής”

Τα αποτελέσματα του πειράματος όπου στις προνύμφες προσφέρθηκε τροφή και από τα τέσσερα είδη φύλλων, όπως και αν εκφράστηκαν (ημερήσια κατανάλωση, ολική κατανάλωση, ημερήσια κατανάλωση ανά μονάδα βάρους προνύμφης) έδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταναλώσεων, ενώ παράλληλα καταγράφηκαν σχετικά υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και νύμφωσης (Πίν. 2). Επίσης, φάνηκε ότι δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ημερήσιου ρυθμού κατανάλωσης των τροφών και του ξηρού βάρους των προνυμφών (Σχ. 8-11). Αναλυτικότερα, φάνηκε ότι οι προνύμφες προτίμησαν την καστανιά, στην οποία καταγράφηκε η υψηλότερη ημερήσια κατανάλωση, σε μικρότερο βαθμό τη βελανιδιά και το πλατάνι, ενώ σχεδόν καθόλου την οξιιά. Το ποσοστό θνησιμότητας ήταν της τάξεως του 20 %, ενώ το ποσοστό νύμφωσης μεταξύ των προνυμφών που επέζησαν μέχρι το τέλος του πειράματος ήταν 20,8 % (Σχ. 12).

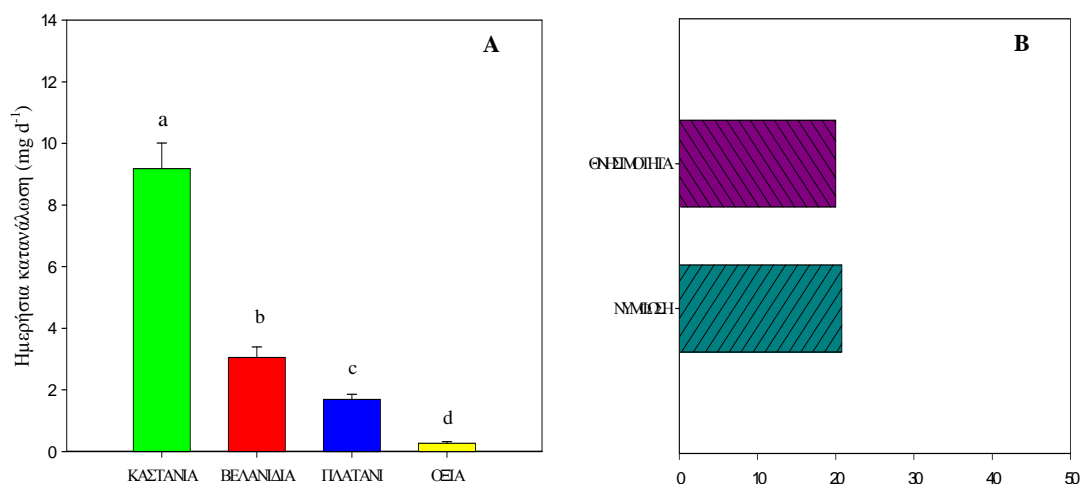
Πίνακας 2: Καταναλώσεις φύλλων καστανιάς, βελανιδιάς, πλατανιού και οξιιάς ταυτόχρονα από τις προνυμφές της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο (n=30).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d ⁻¹)	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d ⁻¹ mg _π ⁻¹)	Ποσοστά (%)
Καστανιά	9,2 ± 0,8 a	89,7 ± 9,5 a	0,49 ± 0,05 a	Θνησιμότητας 20,0
Βελανιδιά	3,1 ± 0,3 b	31,8 ± 3,4 b	0,15 ± 0,02 b	
Πλατάνι	1,7 ± 0,2 c	14,5 ± 1,5 c	0,07 ± 0,01 c	Νύμφωσης 20,8
Οξιιά	0,3 ± 0,1 d	5,1 ± 0,9 d	0,02 ± 0,004 d	

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 8-11: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων καστανιάς (5), βελανιδιάς (6), πλατάνου (7), οξιάς (8) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sexta*.



Σχήμα 12: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d^{-1}) και (B) ποσοστά (%) θνησιμότητας και νύμφωσης των προνυμφών της *M. sequeax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα καστανιάς, βελανιδιάς, πλατανιού και οξιάς στο πείραμα “πολλαπλής επιλογής” ($n=30$).

3.3. Αποτελέσματα πειράματος “επιλογής κατά ζεύγη”

Τα αποτελέσματα του πειράματος όπου στις προνύμφες της *M. sequeax* προσφέρθηκαν φύλλα καστανιάς, βελανιδιάς, πλατανιού και οξιάς σε συνδυασμούς ανά ζεύγη επιβεβαίωσαν τις τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών, έτσι όπως αυτές καταγράφηκαν στο πείραμα της πολλαπλής επιλογής. Οι στατιστικές διαφορές στις τιμές της ημερήσιας κατανάλωσης (mg d^{-1}), ολικής κατανάλωσης (mg) και ημερήσιας κατανάλωσης ανά μονάδα βάρους προνύμφης ($\text{mg d}^{-1} \text{mg}^{-1}$) ήταν σημαντικές σε όλες τις συγκρίσεις, ενώ διαπιστώθηκε ότι υπήρχε πολύ μικρή συσχέτιση μεταξύ των ημερησίων καταναλώσεων και του ξηρού βάρους των προνυμφών, η οποία ήταν αναμενόμενη λόγω του ομοιόμορφου των προνυμφικών βαρών.

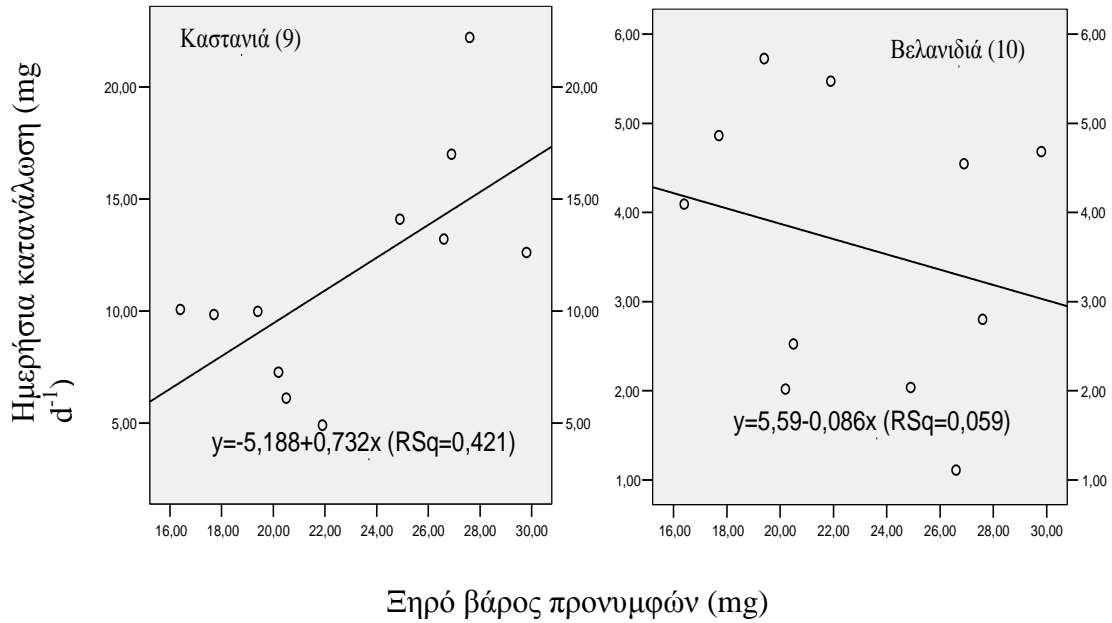
3.3.1. Ζεύγος φύλλων καστανιάς-βελανιδιάς

Συγκεκριμένα, στη σύγκριση των καταναλώσεων (ημερήσια, ολική, ημερήσια ανά μονάδα βάρους προνύμφης) φύλλων καστανιάς και βελανιδιάς από τις προνύμφες υπήρχαν σημαντικές στατιστικές διαφορές, ενώ κατά την διάρκεια του πειράματος το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 10 % και το ποσοστό νύμφωσης στις εναπομείναντες έφτασε στο 38,9 % (Πίν. 3). Συσχέτιση μεταξύ των ημερησίων καταναλώσεων (mg d^{-1}) και του ξηρού βάρους των προνυμφών (mg_π) δεν φαίνεται να υφίσταται από την ανάλυση των δεδομένων (Σχ. 13-14). Στο σχήμα 15, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας και νύμφωσης, ενώ φαίνεται ότι η μέση ημερήσια κατανάλωση των φύλλων καστανιάς είναι σχεδόν τριπλάσια αυτής των φύλλων βελανιδιάς.

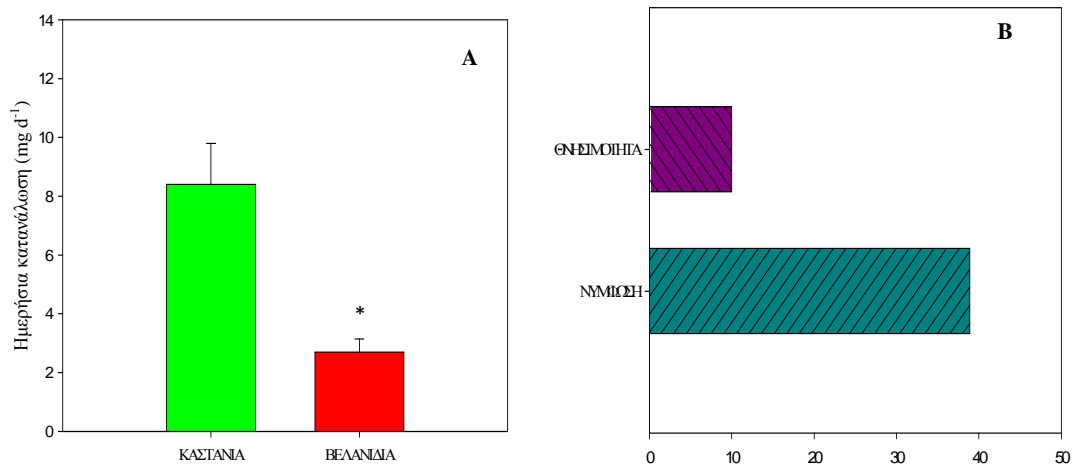
Πίνακας 3: Καταναλώσεις φύλλων καστανιάς και βελανιδιάς από τις προνυμφές της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d^{-1})	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης ($\text{mg d}^{-1} \text{mg}_\pi^{-1}$)	Ποσοστά (%)
Καστανιά	8,4 ± 1,4 a	82,3 ± 14,3 a	0,49 ± 0,05 a	Θνησιμότητας 10,0
Βελανιδιά	2,7 ± 0,4 b	27,8 ± 4,5 b	0,17 ± 0,02 b	Νύμφωσης 38,9

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 13-14: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων καστανιάς (9), βελανιδιάς (10) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήμα 15: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d⁻¹) και (B) ποσοστά (%) θνησιμότητας και νύμφωσης των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα καστανιάς και βελανιδιάς, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

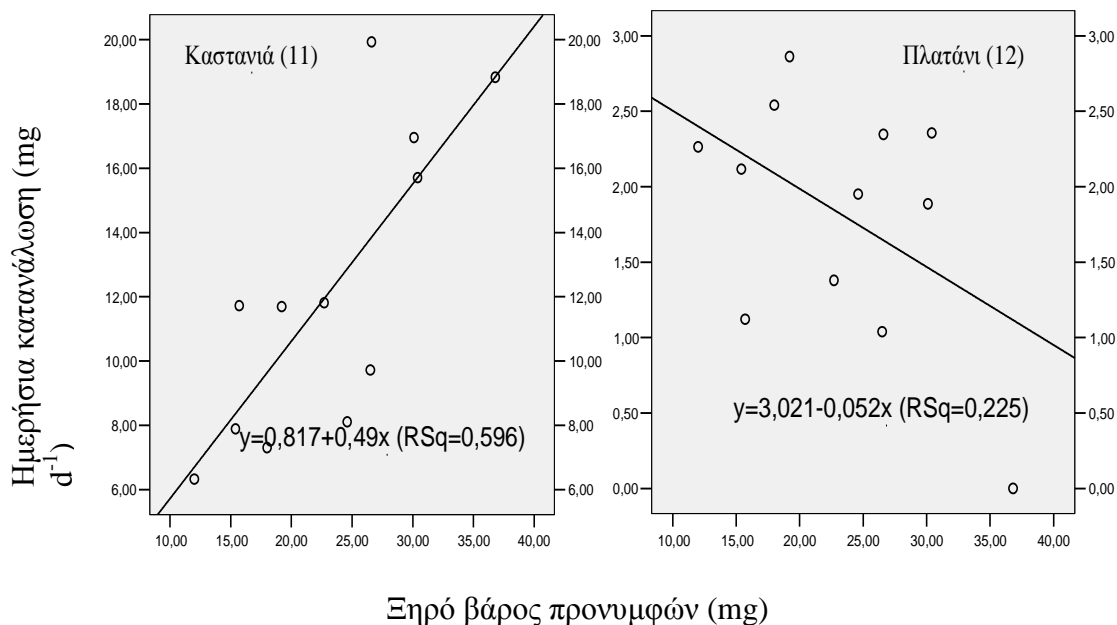
3.3.2. Ζεύγος φύλλων καστανιάς-πλατάνου

Η σύγκριση των καταναλώσεων φύλλων καστανιάς με πλατάνου είτε ήταν εκφρασμένη ως ημερήσια, είτε ως ολική, είτε ως ημερήσια ανά μονάδα βάρους προνύμφης έδειξε σημαντικές στατιστικές διαφορές, ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε ποσοστό θνησιμότητας 20 % και ποσοστό νύμφωσης στις εναπομείνουσες προνύμφες 25 % (Πίν. 4). Επίσης από την ανάλυση των δεδομένων δεν φαίνεται να υφίσταται συσχέτιση μεταξύ των ημερησίων καταναλώσεων (mg d^{-1}) και του ξηρού βάρους των προνυμφών (mg_π) (Σχ. 16-17). Στο σχήμα 18 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας-νύμφωσης, ενώ η μέση ημερήσια κατανάλωση των φύλλων καστανιάς φαίνεται να είναι σχεδόν πενταπλάσια αυτής των φύλλων πλατάνου.

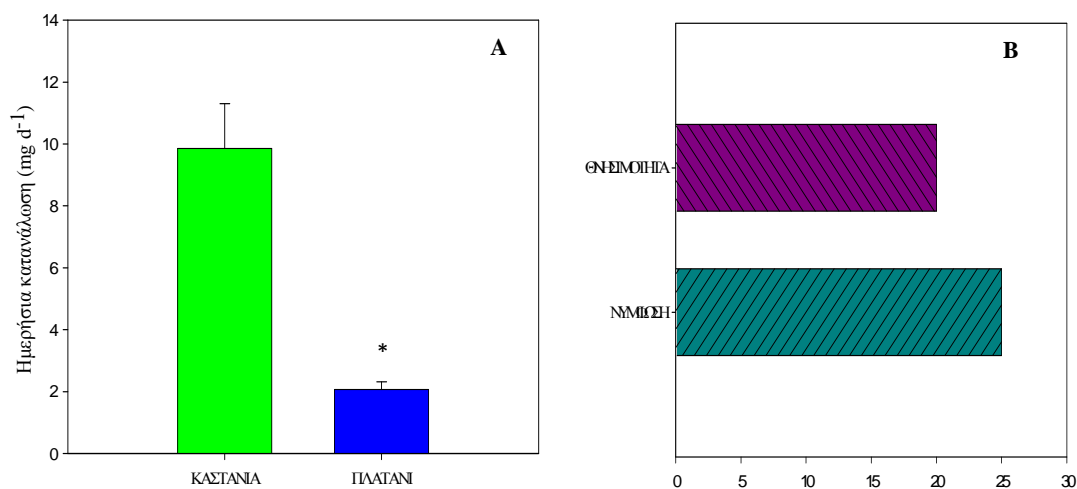
Πίνακας 4: Καταναλώσεις φύλλων καστανιάς και πλατάνου από τις προνυμφές της *M. sexta* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d^{-1})	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης ($\text{mg d}^{-1} \text{mg}_\pi^{-1}$)	Ποσοστά (%)
Καστανιά	9,9 ± 1,5 a	95,9 ± 15,3 a	0,53 ± 0,04 a	Θνησιμότητας 20,0
Πλατάνι	2,1 ± 0,9 b	18,3 ± 1,5 b	0,1 ± 0,01 b	Νύμφωσης 25,0

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 16-17: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων καστανιάς (11), πλατάνου (12) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήμα 18: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d⁻¹) και (B) ποσοστά (%) θνησιμότητας και νύμφωσης των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα καστανιάς και πλατάνου, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

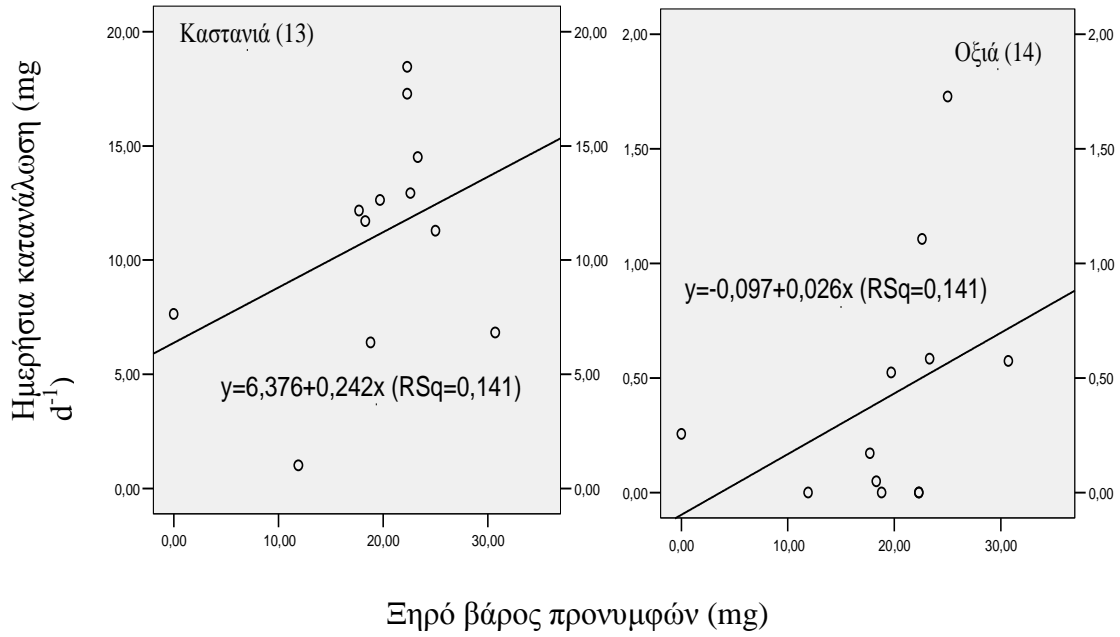
3.3.3. Ζεύγος φύλλων καστανιάς-οξιάς

Στη σύγκριση των καταναλώσεων (ημερήσια, ολική, ημερήσια ανά μονάδα βάρους προνύμφης) φύλλων καστανιάς με οξιάς υπήρχαν σημαντικές στατιστικές διαφορές, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών ήταν 30 % και το ποσοστό νύμφωσης στις εναπομείναντες έφτασε το 21,4 % (Πίν. 5). Από την ανάλυση των δεδομένων δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ημερησίων καταναλώσεων και του ξηρού βάρους των προνυμφών (Σχ. 19-20). Στο σχήμα 21 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας-νύμφωσης, ενώ η μεση ημερήσια κατανάλωση των φύλλων καστανιάς είναι σχεδόν 12πλάσια αυτής των φύλλων οξιάς.

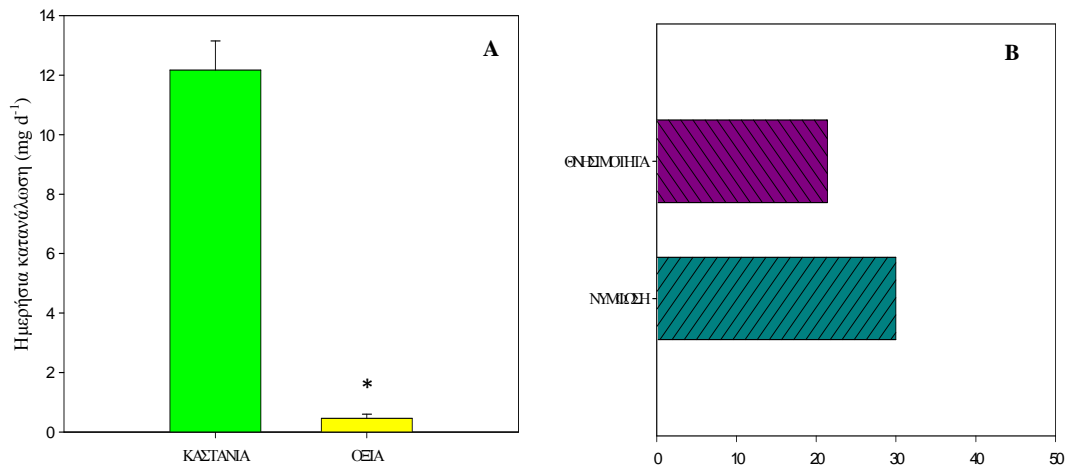
Πίνακας 5: Καταναλώσεις φύλλων καστανιάς και οξιάς από τις προνυμφές της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d ⁻¹)	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d ⁻¹ mg _π ⁻¹)	Ποσοστά (%)
Καστανιά	12,2 ± 1,0 a	112,8 ± 11,9 a	0,54 ± 0,07 a	Θνησιμότητας 30,0
Οξιά	0,4 ± 0,1 b	5,9 ± 1,5 b	0,02 ± 0,008 b	Νύμφωσης 21,4

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 19-20: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων καστανιάς (13), οξιάς (14) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήμα 21: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d⁻¹) και (B) ποσοστά (%) θνησιμότητας και νύμφωσης των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα καστανιάς και οξιάς, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

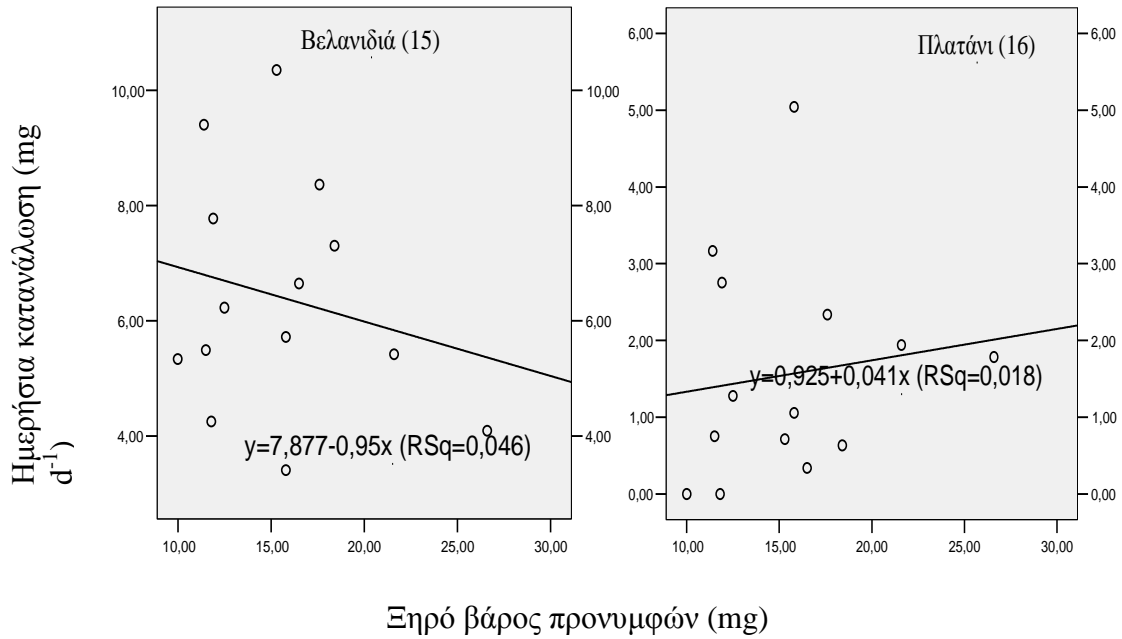
3.3.4. Ζεύγος φύλλων βελανιδιάς-πλατάνου

Στη σύγκριση των καταναλώσεων φύλλων βελανιδιάς με πλατάνου, είτε ήταν εκφρασμένη ως ημερήσια, είτε ως ολική, είτε ως ημερήσια ανά μονάδα βάρους προνύμφης υπήρχε σημαντική στατιστική διαφορά. Κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε ένα ποσοστό θνησιμότητας 10 %, ενώ στις εναπομείναντες προνύμφες το ποσοστό νύμφωσης έφτασε στο 22,2 % (Πίν. 6). Μεταξύ των ημερησίων καταναλώσεων και του ξηρού βάρους των προνυμφών φαίνεται να μην υπάρχει συσχέτιση (Σχ. 22-23). Επίσης στο σχήμα 24 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας και νύμφωσης, ενώ η μέση ημερήσια κατανάλωση των φύλλων βελανιδιάς ήταν σχεδόν τριπλάσια αυτής των φύλλων πλατάνου.

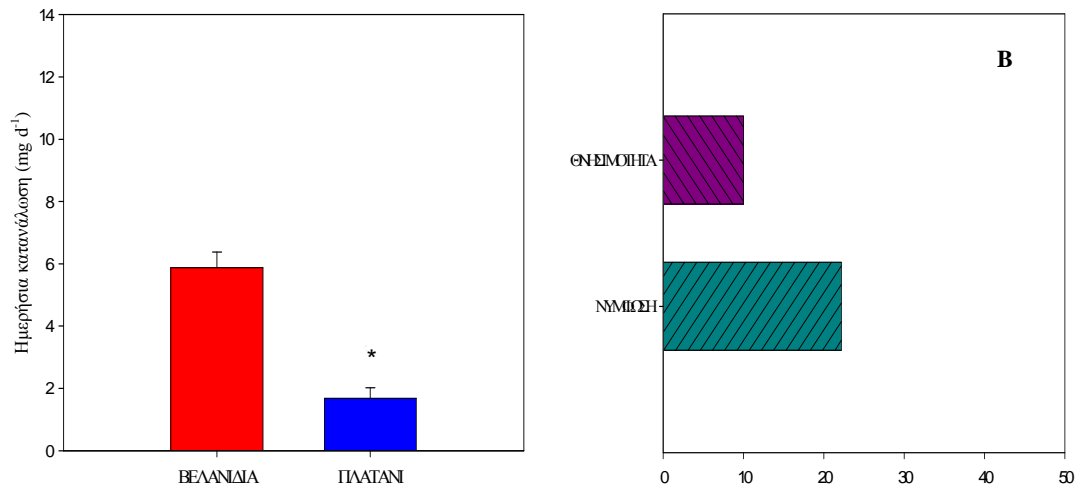
Πίνακας 6: Καταναλώσεις φύλλων βελανιδιάς και πλατάνου από τις προνυμφές της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d ⁻¹)	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d ⁻¹ mg _π ⁻¹)	Ποσοστά (%)
Βελανιδιά	5,9 ± 0,5 a	57,8 ± 5,4 a	0,44 ± 0,05 a	Θνησιμότητας 10,0
Πλατάνι	1,7 ± 0,3 b	17,6 ± 2,9 b	0,12 ± 0,02 b	Νύμφωσης 22,2

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 22-23: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων βελανιδιάς (15), πλατάνου (16) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήμα 24: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d⁻¹) και (B) ποσοστά (%) θνησιμότητας και νύμφωσης των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα βελανιδιάς και πλατάνου, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

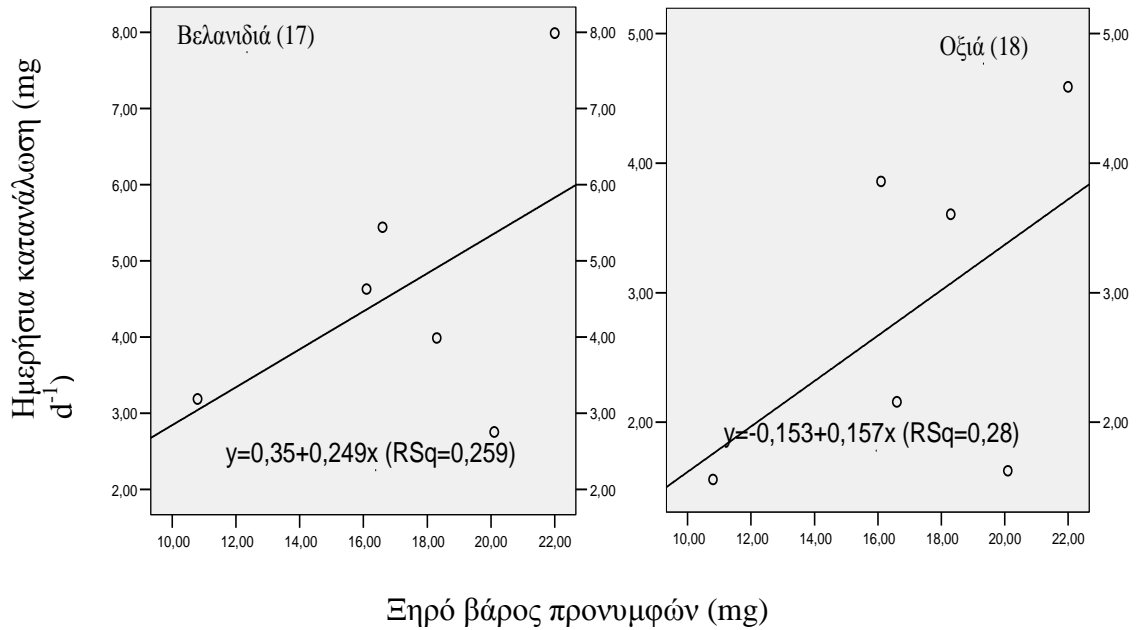
3.3.5. Ζεύγος φύλλων βελανιδιάς-οξιάς

Η σύγκριση των καταναλώσεων (ημερήσια, ολική, ημερήσια ανά μονάδα βάρους προνύμφης) φύλλων βελανιδιάς με οξιάς έδειξε σημαντικές στατιστικές διαφορές, ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος τα ποσοστά θνησιμότητας και νύμφωσης των προνυμφών ήταν 35,5 % και 23,1 %, αντίστοιχα (Πίν. 7). Επίσης, μεταξύ των ημερησίων καταναλώσεων και του ξηρού βάρους των προνυμφών φαίνεται να μην υπάρχει συσχέτιση (Σχ. 25-26). Στο σχήμα 27 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας και νύμφωσης, ενώ η μέση ημερήσια κατανάλωση των φύλλων βελανιδιάς ήταν σχεδόν διπλάσια αυτής των φύλλων οξιάς.

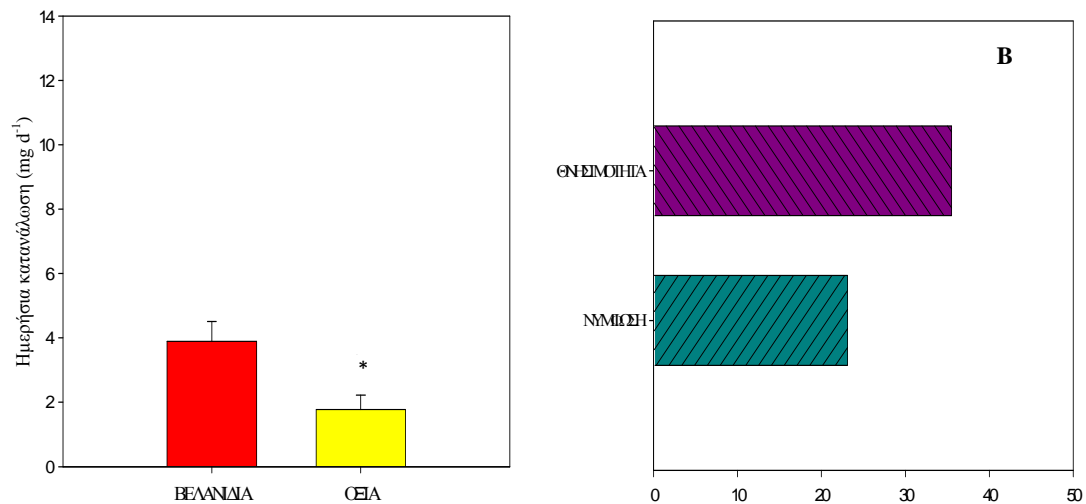
Πίνακας 7: Καταναλώσεις φύλλων βελανιδιάς και οξιάς από τις προνυμφές της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d ⁻¹)	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d ⁻¹ mg _π ⁻¹)	Ποσοστά (%)
Βελανιδιά	3,9 ± 0,6 a	32,8 ± 6,7 a	0,16 ± 0,05 a	Θνησιμότητας 35,5
Οξιά	1,8 ± 0,4 b	17,9 ± 4,6 b	0,10 ± 0,03 b	Νύμφωσης 23,1

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας α=0,05 (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 25-26: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων βελανιδιάς (17), οξιάς (18) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήμα 27: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d⁻¹) και (B) ποσοστά (%) θνησιμότητας και νέμωσης των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα βελανιδιάς και οξιάς, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

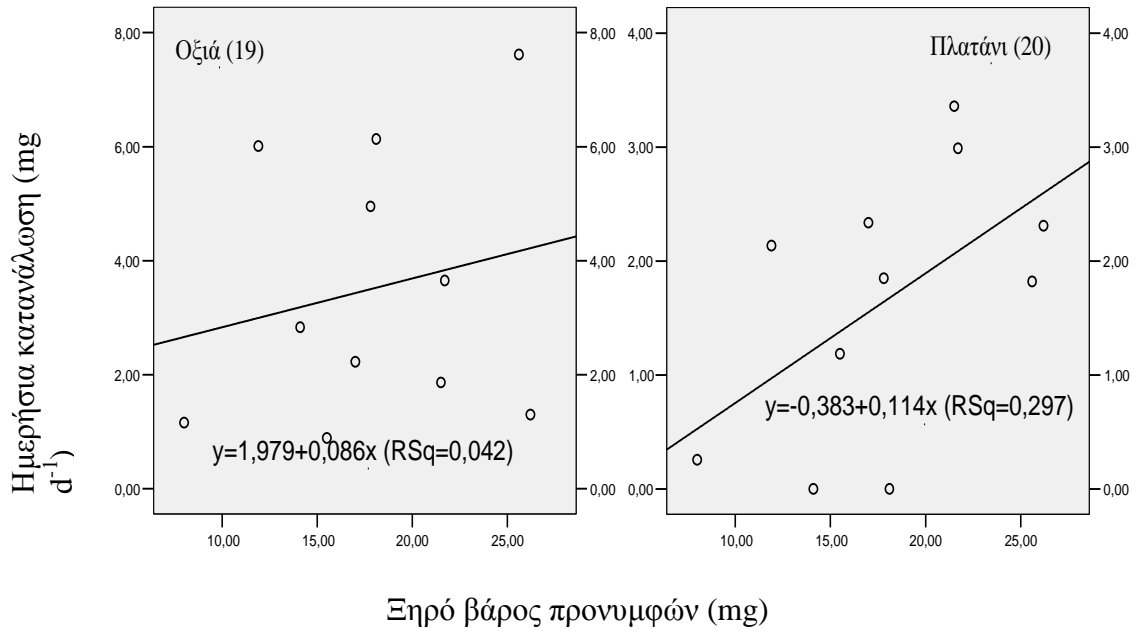
3.3.6. Ζεύγος φύλλων οξιάς-πλατάνου

Στη σύγκριση των καταναλώσεων φύλλων οξιάς με πλατάνου, είτε ήταν εκφρασμένη ως ημερήσια, είτε ως ολική, είτε ως ημερήσια ανά μονάδα βάρους προνύμφης υπήρχε σημαντική στατιστική διαφορά, ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε ποσοστό θνησιμότητας 35,5 % και ποσοστό νύμφωσης στις εναπομείναντες 15,4 % (Πίν. 8). Επίσης, φαίνεται ότι συσχέτιση μεταξύ των ημερησίων καταναλώσεων και του ξηρού βάρους των προνυμφών δεν υπάρχει (Σχ. 28-29). Στο σχήμα 30 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας-νύμφωσης, ενώ η μέση ημερήσια κατανάλωση των φύλλων οξιάς ήταν σχεδόν διπλάσια αυτής των φύλλων πλατάνου.

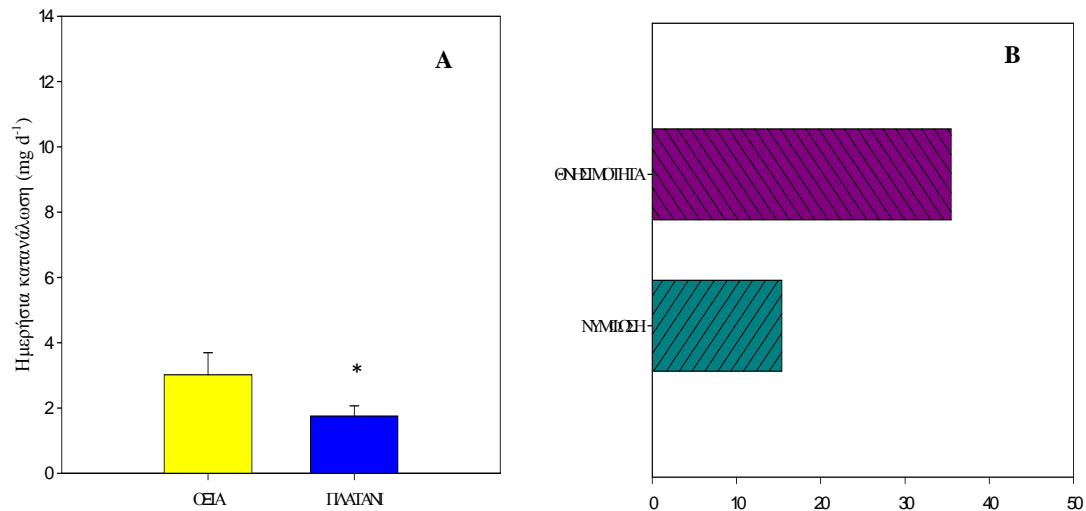
Πίνακας 8: Καταναλώσεις φύλλων οξιάς και πλατάνου από τις προνυμφές της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

Είδος φύλλου	Ημερήσια κατανάλωση (mg d ⁻¹)	Ολική κατανάλωση (mg)	Ημερ. κατ. ανά μονάδα βάρους προνύμφης (mg d ⁻¹ mg _π ⁻¹)	Ποσοστά (%)
Οξιά	3,0 ± 0,7 a	30,7 ± 6,6 a	0,20 ± 0,04 a	Θνησιμότητας 35,5
Πλατάνι	1,6 ± 0,3 b	18,9 ± 2,8 b	0,10 ± 0,01b	Νύμφωσης 15,4

Οι μέσοι όροι στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test, κριτήριο Mann-Whitney).



Σχήματα 28-29: Συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας κατανάλωσης φύλλων οξιάς (19), πλατάνου (20) και του ξηρού βάρους των προνυμφών της *M. sequax*.



Σχήμα 30: (A) Ημερήσια κατανάλωση (mg d⁻¹) και (B) ποσοστά (%) θνησιμότητας και νύμφωσης των προνυμφών της *M. sequax* μετά από 10 ημέρες εκτροφής στο εργαστήριο με φύλλα οξιάς και πλατάνου, στο πείραμα “επιλογής κατά ζεύγη” (n=20).

Γενικά, σε όλες τις περιπτώσεις όπου οι προνύμφες της *M. sequax* είχαν να επιλέξουν ανάμεσα σε δύο είδη τροφής, η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικές διαφορές στις καταναλώσεις μεταξύ των τροφών και στα έξι ζεύγη που δοκιμάστηκαν: καστανιά-βελανιδιά, καστανιά-πλατάνι, καστανιά-οξιά, βελανιδιά-πλατάνι, βελανιδιά-οξιά και οξιά-πλατάνι. Επίσης, η τιμή της μέσης ημερήσιας κατανάλωσης των φύλλων καστανιάς ήταν σε όλες τις συγκρίσεις κατά πολύ μεγαλύτερη των υπολοίπων, ενώ φαίνεται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού ημερήσιας κατανάλωσης των διαφορετικών φύλλων και του ξηρού βάρους των προνυμφών, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι οι προνύμφες που επιλέχθηκαν ήταν σχεδόν ισοβαρείς. Τα ποσοστά θνησιμότητας και νύμφωσης ποικίλαν ανάλογα με το ζεύγος φύλλων που προσφέρονταν σε κάθε περίπτωση.

3.4. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των φύλλων που δοκιμάστηκαν

Η χημική ανάλυση των φύλλων καστανιάς, βελανιδιάς, πλατάνου και οξιάς που δοκιμάστηκαν στα πειράματα που αφορούσαν την κατανάλωση και τις τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών της *M. sequax*, έδειξε ότι τα φύλλα καστανιάς είναι πιο πλούσια σε πρωτεΐνες (7,112 %), έναντι των υπολοίπων. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συνολικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων με τις μεθόδους KJELDAHL και Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), ενώ τα αποτελέσματα της μέτρησης του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των φύλλων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu είναι εκφρασμένα σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέως (GAE) ανά g ξηρού βάρους φύλλου.

Πίνακας 9: Εκατοστιαία περιεκτικότητα (%) σε πρωτεΐνες και θρεπτικά στοιχεία (N, K, Mg, Ca, SO₄, PO₄, NO₃) και συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE g⁻¹ ξηρού βάρους φύλλου) των φύλλων καστανιάς, βελανιδιάς, πλάτανου και οξιάς.

	ΚΑΣΤΑΝΙΑ	ΒΕΛΑΝΙΔΙΑ	ΠΛΑΤΑΝΙ	ΟΞΙΑ
N (%) ^a	1,138	1,041	0,825	0,939
ΠΡΩΤΕΪΝΗ (%) ^a	7,112	6,509	5,158	5,867
K ⁺ (%) ^β	0,246	0,304	0,098	0,182
Mg ⁺ (%) ^β	0,092	0,168	0,132	0,092
Ca ⁺ (%) ^β	1,314	1,920	1,788	1,270
Cl ⁻ (%) ^β	0,037	0,032	0,027	0,017
NO ₃ ⁻ (%) ^β	0,013	0,017	0,020	0,007
SO ₄ ⁻² (%) ^β	Δ.Α.	Δ.Α.	0,030	0,012
PO ₄ ⁻³ (%) ^β	0,025	0,050	0,029	0,005
Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο ^γ	1,57	1,20	1,30	1,90

^a Ολικό άζωτο κατά Kjeldahl, ^β Ανάλυση με HPLC, ^γ Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο με Folin-Ciocalteu, Δ.Α.: Δεν Ανιχνεύθηκε

3.5. Αποτελέσματα ελέγχου σκληρότητας των φύλλων που δοκιμάστηκαν

Ο έλεγχος της σκληρότητας των φύλλων που δοκιμάστηκαν σε όλα τα παραπάνω πειράματα ως υποστρώματα τροφής για τις προνύμφες της *M. sequax* έδειξε ότι οι σκληρότητες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Τα φύλλα καστανιάς είναι τα λιγότερο σκληρά, αφού η δύναμη που χρειάζεται να ασκηθεί

προκειμένου να διατηρηθούν ήταν η μικρότερη, ενώ η δύναμη αυτή κυμαινόταν περίπου στα ίδια επίπεδα μεταξύ των υπόλοιπων ειδών φύλλων (βελανιδιά, πλατάνι και οξιά) (Πίν. 10).

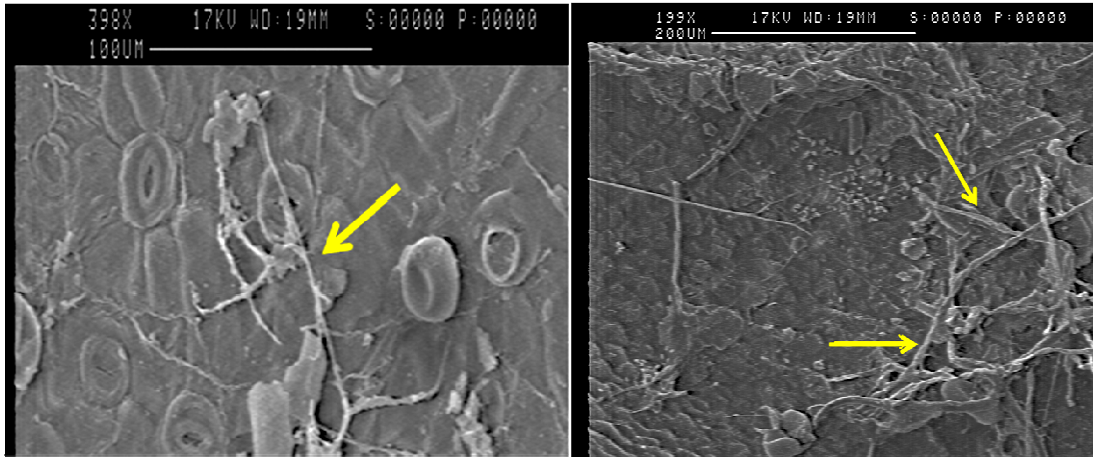
Πίνακας 10: Δύναμη (Newton) που προκαλεί την θραύση των ελασμάτων των φύλλων καστανιάς, βελανιδιάς, πλατάνου και οξιάς που δοκιμάστηκαν σε όλα τα πειράματα.

Είδος φύλλων	Καστανιά	Βελανιδιά	Πλατάνι	Οξιά
Δύναμη (Newton)	1,04 ± 0,04 a	1,69 ± 0,08 b	1,58 ± 0,05 b	1,69 ± 0,07 b

Οι μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ (Tukey test).

3.6. Αποτελέσματα εξέτασης των φύλλων που δοκιμάστηκαν με SEM

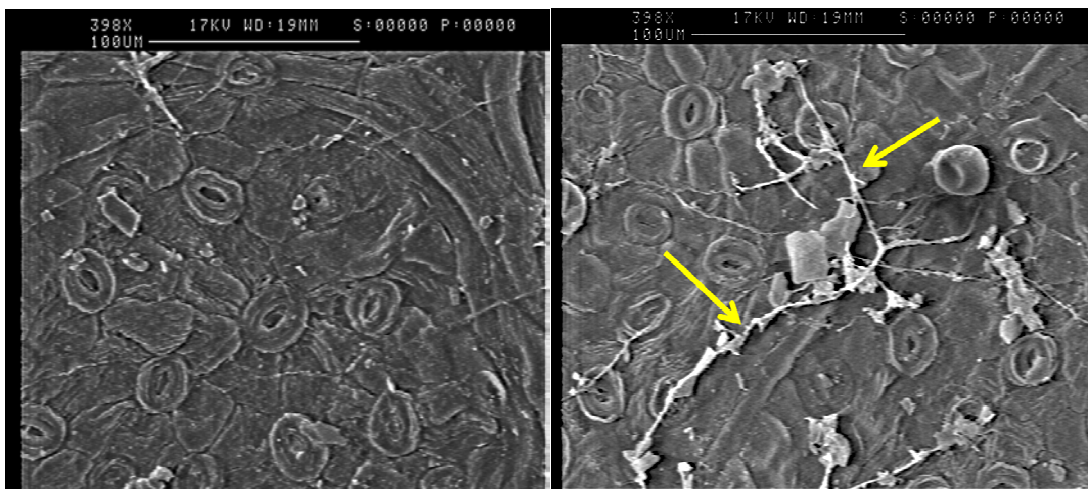
Η εξέταση της επιφάνειας των φύλλων καστανιάς, βελανιδιάς, πλατάνου και οξιάς που δοκιμάστηκαν στα πειράματα που αφορούσαν την κατανάλωση και τις τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών της *M. sequax* με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σαρώσεως (Scanning Electron Microscope, SEM) έδειξε ότι πράγματι στην επιφάνεια όλων των φύλλων είχαν δημιουργηθεί μικροβιακές αποικίες μετά την εφαρμογή του conditioning (Εικ. 13,14). Αντίθετα σε φύλλα που δεν είχαν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού (conditioning), το μικροβιακό φορτίο απουσίαζε από την επιφάνεια των φύλλων αυτών. Στην εικόνα 15 είναι εμφανής η διαφορά μεταξύ των επιφανειών φύλλου πλατάνου χωρίς την επίδραση του conditioning και αυτού μετά την επίδραση του conditioning.



Εικόνα 13: Εικόνες μικροβιακών αποικιών στην επιφάνεια φύλλων οξιάς (αριστερά, x398) και καστανιάς (δεξιά, x199), μετά την επίδραση του conditioning. Διακρίνονται οι μυκηλιακές υφές.



Εικόνα 14: Εικόνα μικροβιακής αποικίας στο στομάτιο φύλλου βελανιδιάς μετά την επίδραση του conditioning (x1580). Διακρίνονται οι μυκηλιακές υφές που έχουν εισέλθει στο στομάτιο.



Εικόνα 15: Εικόνα φύλλου πλατάνου χωρίς την επίδραση του conditioning (αριστερά, x399) και μετά την επίδραση του conditioning (δεξιά, x398). Διακρίνονται οι μυκηλιακές υφές.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος των προνυμφών των Τριχοπτέρων στην αποικοδόμηση της νεκρής φυτικής οργανικής ύλης που συσσωρεύεται στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι αδιαμφισβήτητος και έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές (Graça, 2001).

Στα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων της παρούσας μελέτης καταγράφηκε η ικανότητα των προνυμφών Τριχοπτέρων να διακρίνουν μεταξύ διαφορετικών ειδών φύλλων και να προτιμούν συγκεκριμένες τροφές έναντι άλλων. Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν (πείραμα μη επιλογής, πολλαπλής και κατά ζεύγη επιλογής), οι προνύμφες της *M. sequax* έδειξαν ότι επιλέγουν την τροφή τους και δείχνουν προτίμηση σε συγκεκριμένες τροφές. Όταν τα φύλλα που δοκιμάστηκαν (καστανιάς, βελανιδιάς, πλατάνου και οξιάς) προσφέρθηκαν ξεχωριστά στις προνύμφες (πείραμα μη επιλογής), η ανάλυση των δεδομένων της ημερήσιας κατανάλωσής τους έδειξε ένα αυξημένο ρυθμό κατανάλωσης των φύλλων καστανιάς έναντι των υπόλοιπων φύλλων. Η ημερήσια κατανάλωση φύλλων καστανιάς που καταγράφηκε, ήταν διπλάσια αυτής των φύλλων βελανιδιάς και πλατάνου, ενώ ήταν τριπλάσια αυτής των φύλλων οξιάς. Όταν τα φύλλα προσφέρθηκαν όλα μαζί (πείραμα πολλαπλής επιλογής), οι προνύμφες της *M. sequax*, έδειξαν σαφή προτίμηση στην κατανάλωση ημερησίως φύλλων καστανιάς, τα οποία κατανάωναν σχεδόν σε τριπλάσια ποσότητα σε σχέση με την ημερήσια κατανάλωση των φύλλων βελανιδιάς, σε τετραπλάσια ποσότητα σε σχέση με τα φύλλα πλατάνου, ενώ έδειχναν ελάχιστη προτίμηση στο να καταναλώνουν φύλλα οξιάς. Οι παραπάνω διαφορές ήταν ακόμη μεγαλύτερες όταν η επιλογή γινόταν κατά ζεύγη και η προτίμηση στα φύλλα καστανιάς περισσότερο

εμφανής. Η ημερήσια κατανάλωση φύλλων καστανιάς ήταν σχεδόν τετραπλάσια σε σχέση με των φύλλων βελανιδιάς, πενταπλάσια σε σχέση με των φύλλων πλατάνου, ενώ όταν τέθηκαν σε επιλογή με φύλλα οξιάς, η διαφορά ήταν σχεδόν δωδεκαπλάσια υπέρ των φύλλων καστανιάς (οι προνύμφες κατανάλωσαν αμελητέες ποσότητες φύλλων οξιάς).

Οι τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών Τριχοπτέρων και οι ρυθμοί αποικοδόμησης της οργανικής ύλης στα υδάτινα οικοσυστήματα έχουν απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα και έχουν βρεθεί στο επίκεντρο πολλών μελετών. Στις περισσότερες περιπτώσεις έχει διαπιστωθεί ότι το είδος και η ποιότητα της τροφής επηρεάζει την ποσότητα της νεκρής φυτικής οργανικής μάζας που καταναλώνεται και αποικοδομείται από τις προνύμφες των Τριχοπτέρων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στα οποία είναι εμφανής η διαφορά στους ρυθμούς κατανάλωσης μεταξύ διαφορετικών ειδών φύλλων, βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Rincon και Martinez (2006), οι οποίοι σε παρόμοια εργαστηριακά πειράματα, προσέφεραν 4 διαφορετικά είδη φύλλων (*Anacardium excelsum*, *Ficus sp.*, *Hura crepitans* και *Tabebuia rosea*) ως τροφή σε προνύμφες της *Phylloicus sp.* (Trichoptera: Calamoceratidae). Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Nolen και Pearson (1993), όταν σε προνύμφες *Anisocentropus kirramus* (Trichoptera: Calamoceratidae) προσφέρθηκαν 5 διαφορετικά είδη φύλλων (*Litsea leefeana*, *Cryptocarya densiflora*, *Cryptocarya hypoglauca*, *Syzigium papyraceum*, *Freycinetia scandens*) και οι ημερήσιες καταναλώσεις που καταγράφηκαν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους.

Εκτός της σαφούς προτίμησης των προνυμφών της *M. sequax* σε φύλλα καστανιάς έναντι των υπόλοιπων, η ημερήσια κατανάλωση των φύλλων βελανιδιάς

από τις προνύμφες ήταν μεγαλύτερη αυτής του πλατάνου και της οξιάς, τόσο όταν τα 4 είδη φύλλων προσφέρθηκαν ταυτόχρονα, όσο και όταν προσφέρθηκαν κατά ζεύγη. Διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο πειραματικών προσεγγίσεων προέκυψαν μόνο στην περίπτωση της σύγκρισης των καταναλώσεων φύλλων πλατάνου και οξιάς. Όταν οι προνύμφες είχαν να επιλέξουν μεταξύ και των τεσσάρων τροφών, η ημερήσια κατανάλωση φύλλων πλατάνου ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της οξιάς. Αντίθετα, όταν οι προνύμφες είχαν να διαλέξουν μόνο μεταξύ πλατάνου και οξιάς, η ημερήσια κατανάλωση φύλλων οξιάς ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πλατάνου. Το γεγονός αυτό φανερώνει τη σημασία της χρήσης και των δύο πειραματικών προσεγγίσεων, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα για τις τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών των Τριχοπτέρων και επιβεβαιώνει τους προβληματισμούς των Canhoto *et al.* (2005) για το πώς πρέπει να δίνεται η δυνατότητα στους υπό εξέταση οργανισμούς να επιλέγουν τις διαφορετικές τροφές (με πολλαπλή επιλογή ή με επιλογή κατά ζεύγη ή με οποιονδήποτε άλλο τρόπο) στα πειράματα για τον έλεγχο των τροφικών προτιμήσεων των μακροσπόνδυλων. Αντίστοιχες αναφορές υπάρχουν για περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα πειραμάτων πολλαπλής επιλογής δεν συμπίπτουν απαραίτητα με αυτά πειραμάτων που έγιναν με επιλογή κατά ζεύγος (Manly, 1993).

Στην παρούσα εργασία, η ημερήσια κατανάλωση φύλλων πλατάνου κυμάνθηκε μεταξύ 1,38 και 3,94 mg d⁻¹. Στο μόνο γνωστό άρθρο στον συγγραφέα από τη βιβλιογραφία, σχετικά με τις προτιμήσεις των προνυμφών Τριχοπτέρων σε φύλλα του είδους *Platanus orientalis* (Platanaceae), αναφέρεται ότι το είδος *M. sequax* απορρίπτει πλήρως ή χρησιμοποιεί ελάχιστα τα φύλλα πλατανιού ως τροφή του (Malicky, 1990). Η διαφορά αυτή σε σχέση με τις παρατηρήσεις της παρούσας

μελέτης, παρόλο που τα φύλλα πλατάνου είχαν συλλεχθεί από τον ελλαδικό χώρο, πιθανόν να οφείλεται στο ότι στο πείραμα του Malicky (1990) χρησιμοποιήθηκε φυλή του εντόμου από τη Γαλλία, και συγκεκριμένα από την περιοχή της Βρετάνης. Στο ίδιο πείραμα δοκιμάστηκαν ως καταναλωτές των πλατανόφυλλων και ένα είδος προνυμφών Τριχοπτέρων από την Κρήτη, το *Mesophylax asperses* (Limnophilidae) και τα αποτελέσματα ήταν το ίδιο αρνητικά. Είναι λογικό να υπάρχουν κάποιες διαφορές στις τροφικές προτιμήσεις τόσο μεταξύ ειδών των ίδιων οικογενειών, αλλά και μεταξύ διαφορετικών φυλών, λόγω της διαφορετικής γεωγραφικής τους προέλευσης.

Στη παρούσα μελέτη, οι προνύμφες της *M. sequax* έδειξαν σαφή προτίμηση στην κατανάλωση φύλλων καστανιάς. Η μέτρηση της σκληρότητας των φύλλων, εκφρασμένη ως δύναμη που απαιτείται για τη διάτρηση του φύλλου, έδειξε ότι τα φύλλα καστανιάς ήταν πολύ πιο μαλακά από όλα τα άλλα φύλλα που εξετάστηκαν και επομένως η διάτρηση και αποικοδόμηση τους από τις προνύμφες ήταν ευκολότερη. Επιπλέον, οι χημικές αναλύσεις των φύλλων που δοκιμάστηκαν έδειξαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των βασικών στοιχείων στα φύλλα και χαμηλές συγκεντρώσεις του συνολικού φαινολικού περιεχομένου τους. Το πιο σημαντικό εύρημα των αναλύσεων αυτών ήταν η αυξημένη περιεκτικότητα των φύλλων καστανιάς σε άζωτο, και κατά συνέπεια πρωτεΐνη έναντι των υπολοίπων φύλλων που εξετάστηκαν. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μικρότερη σκληρότητα των φύλλων καστανιάς φαίνεται ότι αποτελούν τους δύο βασικούς παράγοντες προτίμησης της τροφής αυτής, έναντι των άλλων φύλλων.

Οι διαφορετικές τροφικές προτιμήσεις των προνυμφών Τριχοπτέρων έχουν αποδοθεί σε ποικίλους παράγοντες. Σε μια επισκόπηση του θέματος, ο Graça (2001)

αναφέρει ότι η επιλεκτικότητα των προνυμφών των Τριχοπτέρων οφείλεται σε τρεις κυρίως παράγοντες: (α) τη σκληρότητα των φύλλων, (β) την περιεκτικότητα των φύλλων σε θρεπτικές ουσίες και (γ) την παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών (κυρίως πολυφαινολες) στα φύλλα. Η σκληρότητα των φύλλων λειτουργεί σαν ένα φυσικό εμπόδιο για τις προνύμφες, δεδομένου ότι πιο σκληρά φύλλα είναι πιο δύσκολο να τρυπηθούν και αποικοδομηθούν από τις προνύμφες. Οι Nolen και Pearson (1993) παρατήρησαν ότι οι νεαρές προνύμφες *Anisocentropus kirramus* δεν προτιμούσαν να τραφούν με σκληρά φύλλα, ενώ οι Irons *et al.* (1988) σε εργαστηριακά πειράματα με διαφορετικά είδη Τριχοπτέρων, αναφέρουν ότι οι προνύμφες προτιμούν φύλλα με υψηλό θρεπτικό περιεχόμενο, ειδικότερα υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο και πρωτεΐνη. Οι παρατηρήσεις αυτές φαίνεται να συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και ενισχύουν την υπόθεση ότι η σκληρότητα των φύλλων και η περιεκτικότητα των φύλλων σε θρεπτικά στοιχεία είναι δύο παράγοντες που καθορίζουν τόσο τις προτιμήσεις, όσο και τους ρυθμούς κατανάλωση διαφόρων τροφών από τις προνύμφες της *M. sequax*.

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ένα ποσοστό προνυμφών της *M. sequax* νυμφώνονταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ειδικότερα στο πρώτο πείραμα (μή επιλογής), στο οποίο προσφέρθηκαν οι τέσσερις τροφές χωριστά στις προνύμφες παρατηρήθηκαν ποσοστά νύμφωσης από 20 έως 40%. Το μεγαλύτερο ποσοστό νύμφωσης σημειώθηκε όταν οι προνύμφες διατράφηκαν με φύλλα οξιάς, για τα οποία καταγράφηκε και η μικρότερη ημερήσια κατανάλωση. Αντίθετα το μικρότερο ποσοστό νύμφωσης παρατηρήθηκε όταν στις προνύμφες προσφέρθηκαν φύλλα καστανιάς, τα οποία ήταν και τα πιο προτιμητέα από τις προνύμφες, έχοντας τη μεγαλύτερη ημερήσια κατανάλωση. Από το γεγονός αυτό, φαίνεται να υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της διατροφικής αξίας των φύλλων και της εισόδου ή μη των

προνυμφών στη διαδικασία νύμφωσης. Η παραπάνω διαπίστωση συμφωνεί με την παρατήρηση των Merritt και Cummins (1996), σύμφωνα με τους οποίους η νύμφωση μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη ποιότητας των τροφών, αφού τα είδη πολλές φορές αντιδρούν σε δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες, σε περιόδους όπου η τροφή δεν είναι άφθονη ή δεν είναι κατάλληλη, ελαχιστοποιώντας τις βιολογικές τους λειτουργίες. Απαιτείται βέβαια περαιτέρω έρευνα προκειμένου να γίνει αποδεκτό με βεβαιότητα ότι η σχέση αυτή ισχύει και για τις προνύμφες των προνυμφών της *M. sequax*.

Στην παρούσα εργασία έχει προαναφερθεί, ότι τα υδρόβια έντομα - αποικοδομητές προτιμούν για την διατροφή τους φύλλα τα οποία έχουν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αυξημένη παρουσία μικροοργανισμών στην επιφάνεια των φύλλων που έχουν υποστεί τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού, εξετάστηκε η επιφάνεια των φύλλων που δοκιμάστηκαν ως τροφές σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σαρώσεως (SEM). Με τις παρατηρήσεις αυτές έγινε δυνατό να οπτικοποιηθεί το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο φύλλων που έχουν βυθιστεί για κάποιο διάστημα στο νερό και έχουν αποικηθεί από μικροοργανισμούς του νερού (μύκητες, βακτήρια κ.λπ.) σε σχέση με τα φύλλα που δεν έχουν υποστεί αυτή τη διαδικασία. Όπως αναφέρουν πολλοί ερευνητές (Barlocher and Kendrick, 1975; Suberkropp *et al.*, 1983; Graça *et al.*, 1993) η προτίμηση σε φύλλα που φέρουν μικροβιακό φορτίο μπορεί να οφείλεται, είτε στο ότι τα έντομα μπορούν να τραφούν απ'ευθείας από τους οργανισμούς αυτούς, είτε στο ότι οι μικροβιακοί αυτοί οργανισμοί προάγουν την αποσύνθεση, ακολούθως παράγονται ένζυμα που αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα και απελευθερώνονται θρεπτικά στοιχεία με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η λήψη τους από αυτά. Ορισμένοι

ερευνητές υποστηρίζουν ότι η διατροφή των υδρόβιων εντόμων αποκλειστικά με φύλλα χωρίς αποικίες μικροοργανισμών έχει σε ορισμένες περιπτώσεις αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγική ικανότητα τους και μπορεί να αυξήσει τη θνησιμότητα τους (Bueler, 1984; Lawson *et al.*, 1984; Graça *et al.*, 1993). Προς το παρόν όμως δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με το κατά πόσο επηρεάζονται οι τροφικές προτιμήσεις και οι ρυθμοί κατανάλωσης της τροφής από τις προνύμφες της *M. sequax* από τη διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού γι' αυτό και η συγκεκριμένη παράμετρος πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί ότι τόσο οι τροφικές προτιμήσεις, όσο και ο ρυθμός κατανάλωσης των τροφών από τις προνύμφες της *M. sequax*, εξαρτώνται σημαντικά από το είδος και την ποιότητα της τροφής. Το θρεπτικό περιεχόμενο της τροφής καθώς και η σκληρότητα των φύλλων φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την προτίμηση και την κατανάλωση της από τις προνύμφες της *M. sequax*. Σε κάθε περίπτωση, όμως, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση των συστατικών των τροφών (π.χ. δευτερογενείς μεταβολίτες, σάκχαρα, λίπη, αποθητικά βρώσεως κ.α.) και στο πώς αυτά επηρεάζουν τις διατροφικές συνήθειες. Επίσης, παράγοντες όπως η θερμοκρασία του νερού ή η διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού, είναι δυνατόν να επηρεάζουν τις τροφικές προτιμήσεις και τους ρυθμούς κατανάλωσης τροφής από τις προνύμφες της *M. sequax* και πρέπει να εξεταστούν σε βάθος σε μελλοντικές μελέτες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1. Ελληνική

Βερεσόγλου, Δ.Σ. (2002). Οικολογία. Εκδόσεις Έλλα, 417.

Λυκάκης, Σ. (1996). Οικολογία. Εκδόσεις Συμμετρία, 447.

Παπουτσόγλου, Σ.Ε. (1996). Το Υδάτινο Περιβάλλον και οι Οργανισμοί - Εφαρμοσμένη Υδροβιολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, 354.

Σταμόπουλος, Δ.Κ. (2007). Υδρόβια Εντομολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 200.

Τζανακάκης, Μ.Ε. (1995). Εντομολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 501.

5.2. Ξένη

Barlocher, F. and Kendrick B. (1975). Leaf-conditioning by microorganisms. *Oecologia*, 20: 359–362.

Barlocher, F. (1992). The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer-Verlag, Berlin, 225.

Boulton, A.J. and Lake P.S. (1992). Benthic organic matter and detritivorous macroinvertebrates in two intermittent streams in south-eastern Australia. *Hydrobiologia*, 241: 107–118.

Bueler, C.M. (1984). Feeding preference of *Pteronarcys picteti* (Plecoptera: Insecta) from a small acid woodland stream. *Florida Entomologist*, 67: 393–401.

- Carvalho, E.M. and Graça M.A.S. (2007).** A laboratory study on feeding plasticity of the shredder *Sericostoma vittatum* Rambur (Sericostrimatidae). *Hydrobiologia* , 575: 353–359.
- Canhoto, C. and Graça M.A.S. (1992).** Importancia das folhas de eucalipto na alimentacao de detritivoros aquaticos em ribeiros da zona centro de Portugal. *Actas do V Congresso Iberico de Entomologia I*: 473–482.
- Canhoto, C. and Graça M.A.S. (1995).** Food value of introduced eucalyptus leaves for a Mediterranean stream detritivore: *Tipula lateralis*. *Freshwater Biology*, 34: 209–214.
- Canhoto, C., Graça M.A.S. and Barlocher F. (2005).** Feeding preferences. In: *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, Graça M.A., Bärlocher F., Gessner M.O. (Eds.), Springer, 329.
- Chergui, H. and Pettee E. (1991).** An experimental study of the breakdown of submerged leaves by hyphomycetes and invertebrates in Morocco. *Freshwater Biology*, 26: 97–110.
- Clubb, R.W., Gaufin A.R. and Lords J.L. (1975).** Acute cadmium toxicity studies upon nine species of aquatic insects. *Environmental Research*, 9: 332-341.
- Cummins, K.W., Wilzbach M.A., Gates D.M., Perry J.B. and Taliaferro W.B. (1989).** Shredders and riparian vegetation. *Bioscience*, 39: 25–30.
- Feio, M.J. and Graça M.A.S. (2000).** Food consumption by the larvae of *Sericostoma vittatum* (Trichoptera) an endemic species from the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*, 439: 7–11.
- Friberg, N. (1997).** Benthic invertebrate communities in six Danish forest streams: Impact of forest type on structure and function. *Ecography*, 20: 19–28.

- Gonzalez, J.M. and Graça M.A.S. (2003).** Conversion of leaf litter to secondary production by a shredding caddis-fly. *Freshwater Biology*, 48: 1578–1592.
- Graça, M.A.S. (1993).** Patterns and processes in detritus-based stream systems. *Limnologica* 23: 107–114.
- Graça, M.A.S., Maltby L. and Calow P. (1993).** Importance of fungi in diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. II. Effects on growth, reproduction and physiology. *Oecologia*, 96: 304–309.
- Graça, M.A.S. and Ferreira R. (1995).** The ability of selected aquatic hyphomycetes and terrestrial fungi to decompose leaves in freshwater. *Sydowia*, 47: 167–179.
- Graça, M.A.S., Cressa, C., Cessner, M.O., Feio, M.J., Callies K.A. and Barrios C. (2001).** Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshwater Biology*, 46: 947-957.
- Graça, M.A.S. (2001).** The Role of Invertebrates on Leaf Litter Decomposition in Streams – a Review. *International Review of Hydrobiology*, 86: 383-393.
- Gullan, P.J. and Cranston P.S. (2005).** *The Insects, an outline of Entomology* (3rd Edition). Blackwell Publishing Ltd (pbs).
- Hannaford, M.L. and Resh V.H. (1995).** Variability in rapid-bioassessment survey and habitat assessments in a Northern California stream. *Journal of the North American Biological Society*, 14: 430-439.
- Hewlett, R. (2000).** Implications of a taxonomic resolution and sample habitat for stream classification at a broad geographic scale. *Journal of the North American Biological Society*, 19: 352-361.
- Hildrew, A.G., Dobson M.K., Groom A., Ibbotson A., Lancaster J. and Rundle S.D. (1991).** Flow and retention in the ecology of stream invertebrates. *Verh. Internat. Verein. Limnology*, 24: 1742–1747.

- Irons, J.G. III, Oswood M.W. and Bryant J.P. (1988).** Consumption of leaf detritus by a stream shredder: influence of tree species and nutrient status. *Hydrobiologia*, 160: 53-61.
- Iversen, T.M. (1979).** Laboratory energetics of larvae of *Sericostoma personatum* (Trichoptera). *Holarct. Ecol*, 2: 1–5.
- Kiran, U. (1996).** Fungi and food preferences of aquatic invertebrates. *National Academy of Science Letters*, 19: 188–190.
- Lawson, D.L., Klug M.J. and Merrit R.W. (1984).** The influence of the physical, chemical, and microbiological characteristics of decomposing leaves on the growth of the detritivore *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae). *Canadian Journal of Zoology*, 62: 2339–2343.
- Malicky, H. (1990).** Feeding tests with caddis larvae (Insecta: Trichoptera) and amphipods (Crustacea: Amphipoda) on *Platanus orientalis* (Platanaceae) and other leaf litter. *Academic Publishers, Hydrobiologia*, 206: 163-173.
- Manly, B.F.J. (1993).** Comments on design and analysis of multiple-choice feeding-preference experiments. *Oecologia*, 93, 149-152.
- Merritt, R. W. and Cummins K.W. (1996).** *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*. Kendall/Hunt, Dubuque, 862.
- McCafferty, W.P. (1981).** *Aquatic Entomology. The Fisher-men's and Ecologists' Illustrated. Guide to Insects and Their Relatives*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts, 448.
- de Moor, F.C. (1992).** Parasites, generalist and specialist predators and their role in limiting the pollution size of blackflies and in particular *Similium chutteri* Lewis (Diptera: Simuliidae) in Vaal River, South Africa. *Annals of the Cape Provincial Museums (Natural History)*, 18(13): 271-291.

- de Moor, F.C. (2002b).** Shortcoming and advantages of using rapid biological assessment techniques for the purpose of characterizing rivers in South Africa. *Verhandlungen International Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*. Stuttgart, 28: 651-662.
- Nolen, J.A. and Pearson R.G. (1993).** Factors affecting litter processing by *Anisocentropus kirramus* (Trichoptera: Calamoceratidae) from an Australian tropical rainforest stream. *Freshwater Biology*, 29: 469–479.
- Prochazka, K., Stewart B.A. and Davies B.R. (1991).** Leaf litter retention and its implications for shredder distribution in two headwater streams. *Arch. Hydrobiology*, 120: 315–325.
- Rincon J. and Martinez I. (2006).** Food quality and feeding preferences of *Phylloicus sp.* (Trichoptera: Calamoceratidae). *Journal of North American Benthology Society* 2006, 25(1):207–213.
- Rodrigues A.P.L. and Graça M.A.S. (1997).** Enzymatic analysis of leaf decomposition in freshwater by selected aquatic hyphomycetes and terrestrial fungi. *Sydowia*, 49: 160–173.
- Rosenthal G.A. and Jensen D. (1979).** *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, Academic press, N. Y.
- Schulze D.J. and Walker K.F. (1997).** Riparian eucalypts and willows and their significance for aquatic invertebrates in the River Murray, South Australia. *Regulated Rivers: Research and Management*, 13: 557–577.
- Suberkropp, K., Arsuffi T.L. and Anderson J.P. (1983).** Comparison of degradative ability, enzymatic activity, and palability of aquatic hyphomycetes grown on leaf litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 237–244.

Vannote, R.L., Minshall, G.W., Cummins, K.W., Sedell J.R. and Cushing C.E. (1980). The River Continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 130–137.

Wagner, R. (1990). A laboratory study on the cycle of *Sericostoma personatum* (Kirby & Spence) and light dark-dependent. *Hydrobiologia*, 208: 201–212.

Walker, E.D., Kaufman, M.G., Ayres, M.P., Riedel M.H. and Merritt R.W. (1997). Effects of variation in quality of leaf detritus on growth of the eastern tree-hole mosquito, *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Canadian Journal of Zoology*, 75: 706–718.

Wallace J.B. and Webster J.R. (1996). The role of macroinvertebles in stream ecosystem function. *Annual Review of Entomology*, 41: 115-139.

Warnick S.L. and Bell H.L. (1969). The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insect. *Journal of Water Pollution Contaminants*, 41: 280-285.

Waterman P.G. and Mole S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 238.

Webster J. and Benfield E.F. (1986). Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecological Systems*, 17: 567–594.

5.3. Ηλεκτρονική

Mandaville, S.M. (1999). Bioassessment of Freshwaters Using Benthic Macroinvertebrates. A Primer. First Ed. Project E-1. Soil and Water Conservation Society of Metro Halifax. <http://chebucto.ca/Science/SWCS/SWCS.html>

Mandaville, S. M. (2002). Benthic Macroinvertebrates in freshwatres - Taxa tolerance values Metrics and Protocols. Soil and Water Conservation Society of Metro Halifax. <http://chebucto.ca/Science/SWCS/SWCS.html>

Smith, G. (2005). Diversity and Adaptations of the Aquatic Insects. <http://www.faculty.ncf.edu/mccord/pdf>

6. ABSTRACT

The aim of our study was to determine experimentally the feeding preferences between four different leaf species and consumption rates of the decomposer aquatic insect *Micropterna sequax* (Trichoptera: Limnephilidae). The leaf species tested were: *Castanea sativa* (Fagaceae), *Quercus frainetto* (Fagaceae), *Platanus orientalis* (Platanaceae) and *Fagus sylvatica* (Fagaceae). The mentioned leaves were selected because they are parts of the larvae habitat. *M. sequax* larvae were collected in April 2009, from Kodorema creek, (mountain Pelion – Greece; alt.: 1015m) and were acclimated to laboratory conditions for three days before the beginning of the experiments. Leaves from the four native tree species were collected from the same area and after being first air dried, they were stored in the laboratory. Two weeks before beginning the experiments they were put in a local river in order to be colonized by microorganisms (conditioning) and afterwards some of these leaves were used to determine the chemical composition, their hardness and the presence of possible microflora on their surface.

Choice and no-choice feeding consumption bioassays were conducted in order to examine food preferences. Due to different scientific approaches regarding the choice feeding preferences experiments we decided to carry out two kinds of experiments: In the first, the larvae were given a choice between four different leaf species (multiple-choice tests) when in the second, the larvae were given a choice between pairs of leaf species each time (pair-wise tests). The duration of all the above experiments was 10 days.

The no-choice feeding tests revealed a clear preference of the larvae for *C. sativa* leaves while the multiple-choice tests were more revealing showing that the daily consumption of the *C. sativa* leaves was about four times higher than all the others and that the less attractive leaves were those of *F. sylvatica*. Similar results were also obtained in the pair-wise bioassays. The only recorded difference between the multiple and the pair-wise tests was the case where the larvae had to select between *P. orientalis* and *F. sylvatica*. In the first case the statistical analysis showed a clear preference for the *P. orientalis* leaves while the opposite phenomenon was observed in the second case.

The observed preference for the *C. sativa* leaves could be attributed to their higher content in proteins and/or to their lesser degree of hardness in relation to the other 3 kinds of leaves. Similar observations in preference and consumption rates of different kind of leaves have been also recorded by many other authors and were attributed to their different nutrient constituents, their degree of hardness and the presence or not of various microorganisms on their surface.

In all cases tested, a percentage of 10-40% of the *M. sequax* larvae were pupated during the experimentation period. Because pupation can be an indicator of food suitability, in our study the higher percentage was recorded when the larvae were fed with *F. sylvatica* leaves at what time the lower daily consumption rates were observed.

Concluding, the different type of leaf species and different food quality seem to play a significant role in the feeding preferences and food consumption rates of the *M. sequax* larvae. Furthermore, the chemical composition and the hardness of different leaf species seem to affect the feeding habits of the insect. Further research is needed

in order to determine all the factors involved in its eating behavior such as leaf conditioning, presence of secondary metabolites, water temperature e.t.c.

Key words: Trichoptera, *Micropterna sequax*, Kodorema creek, food consumption, food preferences, leaf chemical composition, leaf harshness, conditioning.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 11: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων βελανιδιάς, πλατάνου, οξιάς και καστανιάς στο πείραμα μή επιλογής.

A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Βελανιδιάς (g)	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Πλατάνου (g)	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Οξιάς (g)	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Καστανιάς (g)
1	0,0203	0,0897	0,0204	0,0481	0,0186	0,0344	0,0243	0,0673
2	0,0163	0,0563	0,022	0,0716		0,0228		0,0327
3	0,0301	0,0939	0,0198	0,0745		0,0227	0,0273	0,0896
4	0,0195	0,1076		0,022		0,0286	0,0339	0,088
5	0,0216	0,0805		0,0408		0,0381		0,0633
6	0,0212	0,0965		0,0207	0,0295	0,0167	0,0338	0,0803
7	0,0309	0,0658		0,0313	0,0197	0,0393	0,0284	0,0459
8		0,0959	0,0197	0,0409	0,0225	0,0378	0,0259	0,065
9		0,0536	0,0284	0,0518	0,0222	0,0379		0,0375
10	0,0247	0,0364	0,0145	0,0306	0,0248	0,0499	0,0316	0,0791
11	0,0258	0,0811		0,0342	0,0193	0,0291		0,0672
12	0,0304	0,0358	0,0298	0,0509	0,03	0,0437		0,0215
13	0,0232	0,0542	0,0179	0,0705	0,0191	0,0402	0,038	0,0634
14	0,0293	0,0671	0,0321	0,0264		0,0248	0,0279	0,091
15		0,0687		0,0343	0,0189	0,033	0,0399	0,1141
16	0,0581	0,0264		0,0535	0,0106	0,0204	0,0217	0,0427
17	0,0245	0,0763	0,0234	0,0476	0,02	0,0267	0,0228	0,0586
18	0,0266	0,1008	0,0159	0,0467		0,0116	0,0235	0,0826
19	0,0258	0,045		0,0326	0,0128	0,0166	0,0299	0,0875
20	0,0204	0,072	0,0277	0,0137		0,0392	0,0362	0,0782
21		0,0334	0,027	0,012	0,0156	0,0485	0,0393	0,0763
22	0,0172	0,1117	0,0241	0,0761		0,0279		0,0159
23		0,0383	0,0152	0,0201		0,0112		0,0437
24	0,0318	0,0558	0,0137	0,0313	0,023	0,0446	0,0125	0,0344
25		0,0383	0,028	0,0605	0,0219	0,0295	0,0308	0,0839
26	0,0171	0,0808		0,045	0,0102	0,0412	0,0344	0,0778
27	0,027	0,0616	0,0178	0,0333		0,0225		0,0737
28		0,0951	0,0213	0,046	0,0293	0,0233		0,0393
29	0,0224	0,0577		0,031		0,0299	0,0296	0,0746
30	0,0199	0,0473	0,0132	0,0284		0,0274	0,0253	0,0452

Πίνακας 12: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων βελανιδιάς, πλατάνου, οξιάς και καστανιάς στο πείραμα πολλαπλής επιλογής.

A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Βελανιδιάς (g)	Δισκίο φύλλου Πλατάνου (g)	Δισκίο φύλλου Οξιάς (g)	Δισκίο φύλλου Καστανιάς (g)
1		0,0279	0,0426	0,0253	0,0579
2		0,0454	0,0486	0,0286	0,0217
3		0,0261	0,0325	0,0171	0,0157
4		0,0436	0,0269	0,0129	0,0135
5	0,0273	0,0559	0,0331	0,0169	0,0748
6	0,0224	0,0796	0,0366	0,0168	0,0572
7	0,0194	0,046	0,0309	0,0183	0,0868
8	0,0162	0,048	0,0427	0,0124	0,1007
9		0,0738	0,0171	0,0125	0,1176
10		0,0689	0,0371	0,0122	0,0727
11	0,0163	0,056	0,0288	0,0194	0,0751
12		0,0517	0,04	0,0152	0,0586
13	0,0175	0,0457	0,0615	0,0173	0,0537
14	0,0234	0,0494	0,0623	0,0084	0,124
15		0,0278	0,03	0,035	0,0612
16	0,0149	0,0513	0,0326	0,0158	0,0679
17	0,0213	0,0657	0,0324	0,0151	0,1154
18	0,0162	0,0417	0,0454	0,066	0,1187
19	0,0198	0,0483	0,0188	0,0231	0,0592
20	0,029	0,0652	0,0327	0,025	0,0856
21	0,0183	0,0292	0,0411	0,024	0,0669
22	0,0307	0,0677	0,0515	0,0109	0,0907
23	0,024	0,077	0,033	0,0218	0,1038
24	0,0164	0,0195	0,0252	0,0193	0,0789
25	0,0175	0,0637	0,0286	0,0157	0,0956
26		0,0425	0,0503	0,0287	0,0364
27	0,0242	0,0734	0,0336	0,0139	0,1061
28		0,0678	0,038	0,022	0,0807
29	0,0148	0,0594	0,0171	0,0113	0,079
30	0,021	0,0368	0,0354	0,013	0,0659

Πίνακας 13: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων καστανιάς και βελανιδιάς στο πείραμα επιλογής κατά ζεύγη.

A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Καστανιάς (g)	Δισκίο φύλλου Βελανιδιάς (g)
1	0,0177	0,0964	0,0562
2	0,0266	0,0955	0,0918
3	0,0202	0,0573	0,032
4	0,0276	0,0713	0,0246
5	0,0249	0,0867	0,083
6		0,0279	0,0404
7		0,0751	0,0682
8	0,0194	0,1273	0,048
9		0,0934	0,0391
10	0,0219	0,0806	0,0504
11		0,0306	0,0671
12		0,0494	0,0525
13		0,0492	0,0572
14		0,0857	0,0417
15		0,0328	0,0475
16	0,0164	0,0942	0,0635
17	0,0269	0,0904	0,0592
18	0,0205	0,0687	0,0272
19		0,046	0,0507
20	0,0298	0,1014	0,0579

Πίνακας 14: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων καστανιάς και πλατάνου στο πείραμα επιλογής κατά ζεύγη.

A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Καστανιάς (g)	Δισκίο φύλλου Πλατάνου (g)
1	0,0265	0,0389	0,036
2		0,0302	0,0347
3		0,0244	0,0489
4		0,0459	0,0287
5	0,0154	0,0835	0,0257
6	0,0304	0,1032	0,0231
7	0,0157	0,078	0,0365
8		0,0464	0,027
9		0,0205	0,034
10	0,0266	0,0938	0,0232
11	0,0227	0,0771	0,0337
12	0,018	0,057	0,0211
13		0,0717	0,0275
14	0,0368	0,0724	0,0529
15		0,0949	0,0371
16	0,0246	0,1136	0,0275
17	0,0265	0,0977	0,0374
18	0,0301	0,0909	0,0282
19	0,012	0,0344	0,0241
20	0,0192	0,1105	0,0176

Πίνακας 15: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων καστανιάς και οξιάς στο πείραμα επιλογής κατά ζεύγη.

A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Καστανιάς (g)	Δισκίο φύλλου Οξιάς (g)
1		0,084	0,0208
2		0,0739	0,0143
3	0,0119	0,0867	0,0256
4	0,0226	0,0983	0,0078
5	0,0197	0,1013	0,0126
6	0,025	0,1145	0,0196
7		0,0498	0,0265
8	0,0177	0,1058	0,0155
9		0,0507	0,0191
10	0,0223	0,0877	0,0176
11	0,0307	0,0939	0,0291
12		0,0529	0,025
13	0,0183	0,0781	0,0165
14		0,0514	0,0156
15		0,097	0,0081
16	0,0188	0,0982	0,0201
17		0,0559	0,0148
18	0,0233	0,115	0,0121
19	0,0223	0,1083	0,0188
20		0,0521	0,0154

Πίνακας 16: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων βελανιδιάς και πλατάνου στο πείραμα επιλογής κατά ζεύγη.

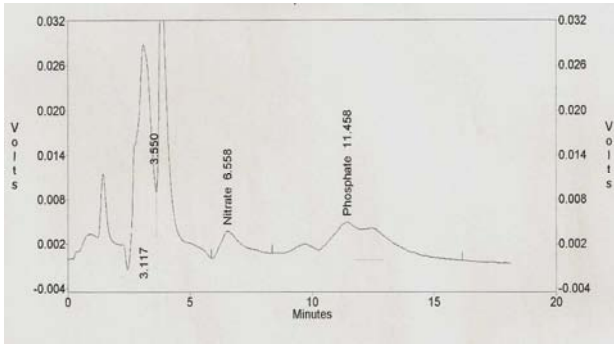
A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Βελανιδιάς (g)	Δισκίο φύλλου Πλατάνου (g)
1	0,0266	0,0635	0,0293
2		0,0389	0,0404
3	0,0158	0,07	0,0859
4	0,0184	0,0842	0,0418
5	0,0176	0,0741	0,0233
6		0,0553	0,0303
7	0,0158	0,0992	0,0913
8	0,0118	0,062	0,0531
9	0,0216	0,0509	0,0276
10	0,0153	0,1064	0,0409
11		0,0655	0,0629
12	0,0115	0,0502	0,0405
13	0,0119	0,0797	0,0188
14	0,0114	0,1154	0,063
15	0,0125	0,0944	0,0348
16		0,076	0,0342
17	0,01	0,0517	0,0554
18	0,0165	0,0904	0,045
19		0,054	0,0351
20		0,0754	0,0146

Πίνακας 17: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων βελανιδιάς και οξιάς στο πείραμα επιλογής κατά ζεύγη.

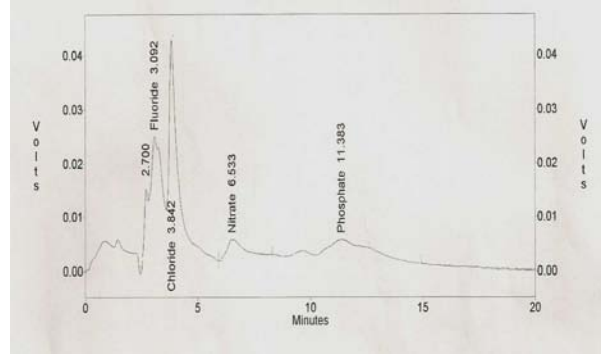
A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Βελανιδιάς (g)	Δισκίο φύλλου Οξιάς (g)
1		0,0884	0,0255
2	0,0201	0,0355	0,0258
3	0,0188	0,0301	0,0396
4		0,048	0,0488
5	0,0183	0,0645	0,0549
6	0,0166	0,0507	0,0499
7		0,0624	0,0144
8		0,0471	0,0143
9		0,0317	0,0144
10	0,0116	0,0382	0,0527
11	0,0169	0,0513	0,0358
12	0,0161	0,0584	0,0359
13	0,022	0,1265	0,0299
14		0,023	0,0287
15		0,0482	0,0197
16	0,0108	0,0721	0,021
17		0,0428	0,0197
18		0,0617	0,0354
19	0,0132	0,0506	0,028
20		0,0299	0,0162

Πίνακας 18: Αποτελέσματα των μετρήσεων του ξηρού βάρους (g) των προνυμφών και των δισκίων φύλλων βελανιδιάς και οξιάς στο πείραμα επιλογής κατά ζεύγη.

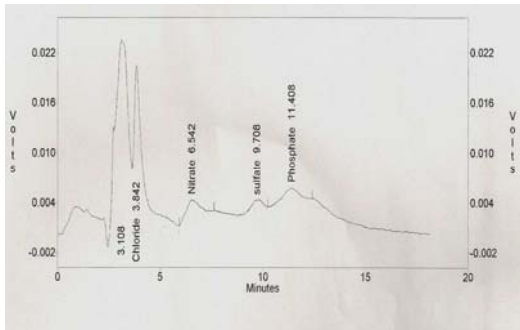
A/A	Προνύμφη (g)	Δισκίο φύλλου Οξιάς (g)	Δισκίο φύλλου Πλατάνου (g)
1		0,0212	0,0663
2	0,0215	0,0523	0,0609
3		0,0471	0,0209
4	0,0181	0,051	0,0525
5		0,0318	0,0459
6	0,0119	0,0351	0,0255
7		0,0446	0,026
8	0,017	0,0324	0,072
9	0,0178	0,0438	0,0286
10		0,0307	0,051
11	0,008	0,0412	0,0459
12	0,0155	0,0603	0,0358
13		0,0272	0,0583
14	0,0262	0,0231	0,0236
15	0,0141	0,0105	0,0546
16		0,0227	0,0298
17		0,0692	0,0267
18		0,0199	0,0477
19	0,0256	0,0388	0,0776
20	0,0217	0,0545	0,0649



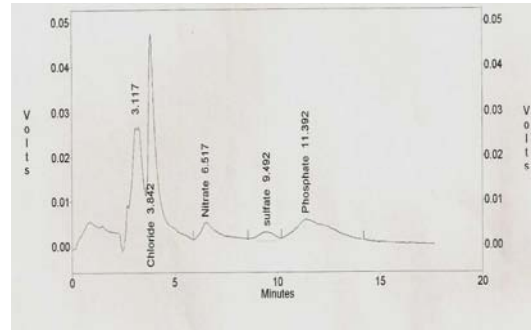
Σχήμα 31: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των ανιόντων σε φύλλα βελανιδιάς



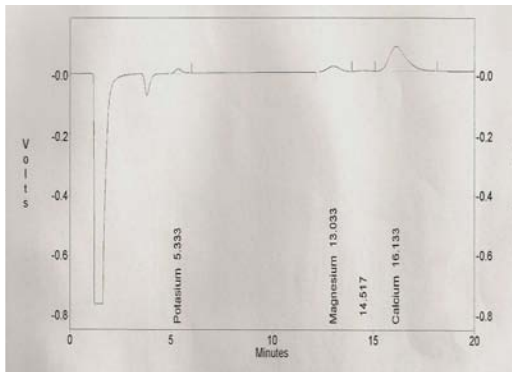
Σχήμα 32: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των ανιόντων σε φύλλα καστανιάς



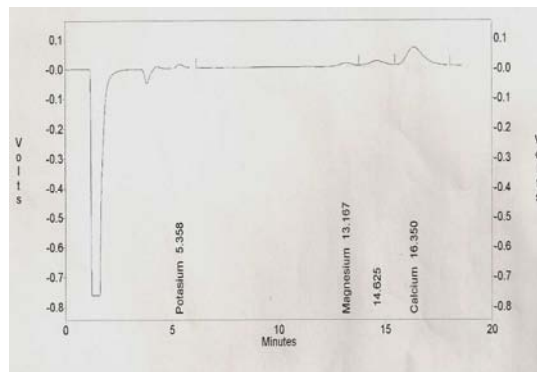
Σχήμα 33: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των ανιόντων σε φύλλα οξιδιάς



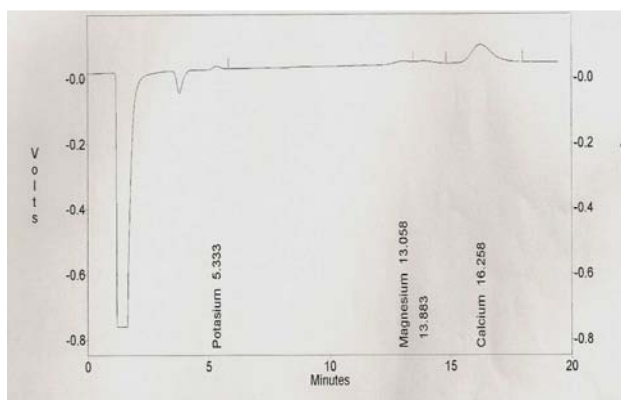
Σχήμα 34: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των ανιόντων σε φύλλα πλατάνου



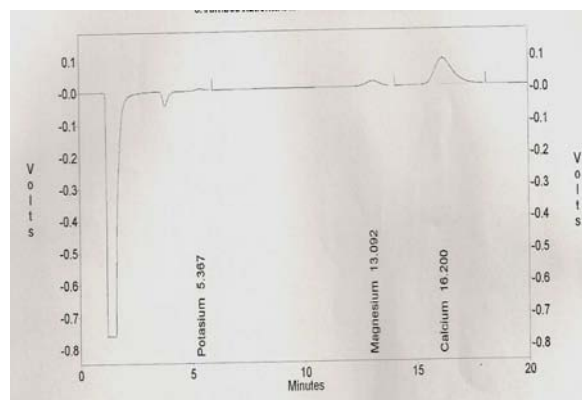
Σχήμα 35: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των κατιόντων σε φύλλα βελανιδιάς



Σχήμα 36: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των κατιόντων σε φύλλα καστανιάς



Σχήμα 37: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των κατιόντων σε φύλλα οξιάς



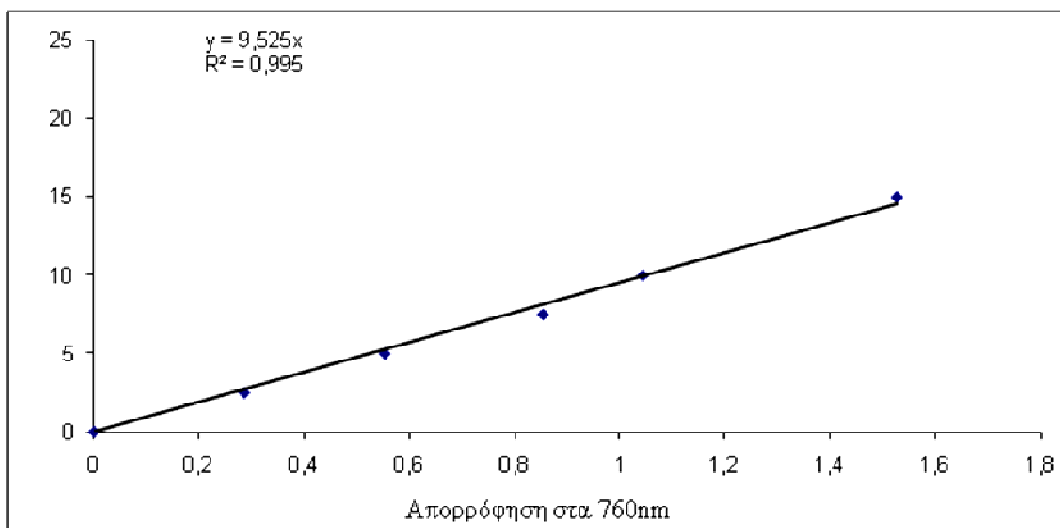
Σχήμα 38: Αποτελέσματα μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό των κατιόντων σε φύλλα πλατάνου

Πίνακας 19: Αποτελέσματα των μετρήσεων της μεθόδου Kjeldahl, σε φύλλα καστανιάς, οξιάς, πλατάνου και βελανιδιάς που είχαν υποστεί την διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΒΑΡΟΣ (g)	HCl (ml)	Κενό (ml)
1	0	0,27	0,29
2	0	0,17	0,29
3	0	0,44	0,29
Καστανιά(A)	0,1995	1,82	0,29
Καστανιά(B)	0,1997	2,01	0,29
Οξιά(A)	0,2002	1,53	0,29
Οξιά(B)	0,2002	1,74	0,29
Πλατάνι(A)	0,1996	1,39	0,29
Πλατάνι(B)	0,2014	1,56	0,29
Βελανιδιά(A)	0,2005	1,87	0,29
Βελανιδιά(B)	0,2003	1,7	0,29
Βελανιδιά(Γ)	0,2017	1,79	0,29

Πίνακας 20: Αποτελέσματα των μετρήσεων της μεθόδου Folin-Ciocalteu, σε φύλλα καστανιάς, οξιάς, πλατάνου και βελανιδιάς που είχαν υποστεί την διαδικασία του μικροβιακού αποικισμού.

ΦΥΛΛΑ	Δείγμα	760nm	mg gallic%	mg gallic%
ΟΞΙΑ	1	0,094	1,791	1,895
	2	0,105	2,000	
ΚΑΣΤΑΝΙΑ	3	0,086	1,683	1,572
	4	0,079	1,505	
ΒΕΛΑΝΙΔΙΑ	5	0,061	1,162	1,191
	6	0,064	1,219	
ΠΛΑΤΑΝΙ	7	0,088	1,676	1,305
	8	0,049	0,933	



Σχήμα 39: Πρότυπη καμπύλη από τα αποτελέσματα της απορρόφησης γαλλικού οξέως (τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράζονται mg GAE/ g ξηρού βάρους φύλλου).