



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΙΡΑΙΩΣ  
ΤΜΗΜΑ ΝΑΥΤΙΛΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗ  
ΝΑΥΤΙΛΙΑ

**Διπλωματική Εργασία**

«Πρωτόκολλα πειραμάτων θερμικής αντοχής και επιγενετικών πειραμάτων σε θαλάσσιες ανεμώνες»

Φοιτητής: Λουκόπουλος Ηλίας (Α.Μ.: mn13052)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σακελλαριάδου Φανή

Πειραιάς, 2015

## **Περιεχόμενα**

**Στόχος εργασίας** .....σελ.4

**Abstract** .....σελ.5

### **Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή**

1.1.: Θερμικά Καθεστώτα .....σελ.6

1.2.: Είδη ξενιστές .....σελ.9

1.3.: Τα κατάλληλα ζώα για το πείραμα .....σελ.11

### **Κεφάλαιο 2: Μεταβλητές – παράμετροι**

2.1.: Response variables .....σελ.13

2.2.: Ποιότητα νερού .....σελ.18

2.2.1.: Αμμώνιο (NH<sub>4</sub>) .....σελ.18

2.2.2.: Νιτρικό (NO<sub>2</sub>) .....σελ.19

2.2.3.: Καθαρισμός δοχείων ανεμώνων .....σελ.20

2.2.4.: Αλατότητα νερού .....σελ.20

2.2.5.: Θερμοκρασία και Οξυγόνο .....σελ.21

### **Κεφάλαιο 3: Το πείραμα**

3.1.: Σχεδιασμός πειραμάτων

3.1.1.: Γενιές των ανεμώνων .....σελ.22

3.1.2.: Πιλοτικό πείραμα .....σελ.22

3.1.3.: Πείραμα 1: Εντοπίζοντας το εύρος του ανώτερου παραθύρου θερμικής αντοχής .....σελ.24

3.1.4.: Πείραμα 2: Έλεγχος για διαγενεαλογική πλαστικότητα .....σελ.25	
3.2.: Παροχή θαλασσινού νερού	
3.2.1.: Προέλευση του νερού .....σελ.27	
3.2.2.: Διαχείριση θαλασσινού νερού .....σελ.28	
3.2.3.: Διανομή του θαλασσινού νερού .....σελ.28	
3.3.: Γενικό στήσιμο εργαστηρίου – Εργαλεία	
3.3.1.: Εργαλεία .....σελ.30	
3.3.2.: Στήσιμο .....σελ.32	
3.4.: Συλλογή test animals .....σελ.33	
3.5.: Καλλιέργεια Αρτέμια	
3.5.1.: Γενικό στήσιμο .....σελ.36	
3.5.2.: Τεχνική Ταΐσματος .....σελ.38	
3.5.3.: Ξεκινώντας την καλλιέργεια .....σελ.38	
3.5.4.: Συλλογή .....σελ.38	
Σχολιασμός .....σελ.39	
Βιβλιογραφία – Αρθρογραφία .....σελ.40	
Προτεινόμενη Αρθρογραφία – Βιβλιογραφία .....σελ.43	

## **Στόχος εργασίας**

Ο Στόχος αυτής της εργασίας είναι να μελετήσει τη διαφορά στη ζωή και τη συμπεριφορά των θαλάσσιων ανεμώνων, όταν αυτές εκτεθούν σε θερμικά στρες.

Η αρχική ερώτηση που τέθηκε από την ομάδα έρευνας<sup>1</sup> ήταν η εξής: «Θαλάσσια ασπόνδυλα σε έναν ωκεανό του οποίου η θερμοκρασία συνεχώς αυξάνεται: Διαφέρει το εύρος της θερμικής αντοχής των πληθυσμών ή των ειδών, τα οποία έχουν προσαρμοστεί σε θερμά ή ψυχρά κλίματα; Παρουσιάζουν αυτοί οι πληθυσμοί διαγενεαλογικό εγκλιματισμό;». Πάνω λοιπόν σε αυτό τον προβληματισμό, στήθηκε μία σειρά επιγενετικών πειραμάτων και πειραμάτων θερμικής αντοχής. Στόχος του προγράμματος, ήταν να υπάρξουν επτά διαφορετικοί σταθμοί, οι οποίοι να καλύπτουν σε εύρος όλα τα πιθανά θερμικά καθεστώτα του πλανήτη.

Σαφώς η κινητήριος δύναμη της επιλογής αυτού του θέματος, ήταν οι επιπτώσεις της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Επομένως, η εξερεύνηση διάφορων μορφών κατανομής οι οποίες έχουν σχέση με τη θερμοκρασία, παγκοσμίως, συνδυασμένη με έρευνες που ως στόχο έχουν τον εντοπισμό του εύρους της θερμικής αντοχής και του θερμικού στρες, θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην εξεύρεση προβλέψεων για το πώς θα επηρεάσει η υπερθέρμανση του πλανήτη την λειτουργία και την πληθυσμιακή αφθονία των θαλάσσιων οργανισμών στις διάφορες κλιματικές ζώνες.

Όσο προχωρά η αναδίπλωση της παρούσας εργασίας, θα γίνεται πιο σαφής και η μεθοδολογία αλλά και το σκεπτικό του πειράματος.

---

<sup>1</sup> Η εργασία αυτή είναι απόρροια της συνεργασίας με το πρόγραμμα GAME του ινστιτούτου GEOMAR του Κιέλου της Γερμανίας. Οι χώρες στις οποίες στήθηκαν σταθμοί ήταν Βραζιλία, Ελλάδα, Ιαπωνία, Ινδονησία, Ουαλία, Πορτογαλία και Χιλή. Στο πρόγραμμα αυτό συμμετείχαν 14 ερευνητές και 7 ομάδες καθηγητών επίβλεψης (σε κάθε χώρα από μία ομάδα, η οποία είχε τουλάχιστον έναν καθηγητή και βοηθητικό προσωπικό).

## **Abstract**

Στην παρούσα έρευνα μελετώνται οι επιπτώσεις της υπερθέρμανσης των θαλασσών, εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής, σε ανθόζωα μικρού μεγέθους. Τα αποτελέσματα τα οποία δυνητικά θα μπορούσαν να προκύψουν από την ολοκλήρωση της έρευνας, προκύπτουν από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων πολλαπλών πειραμάτων και διαδικασιών που αναλύονται στο corpus της παρούσας εργασίας.

Το πρώτο πείραμα επικεντρώνεται στο εύρος της θερμικής αντοχής, ενώ το δεύτερο πείραμα αξιολογεί τις επιπτώσεις του θερμικού στρες μεταξύ των γενεών των ανθοζώων. Ως κατάλληλα ανθόζωα, για τα πειράματα αυτά, θεωρήθηκαν τα ήδη *Haliplanella* και *Aptasia*<sup>2</sup>, τα οποία συναντώνται κυρίως ως είδη «ξενιστές» σε πολλά παράκτια οικοσυστήματα παγκοσμίως και τα οποία μπορούν να αποτελέσουν κατάλληλα είδη για σύγκριση στους περισσότερους, αν όχι όλους, ερευνητικούς σταθμούς.

Το πλεονέκτημα αυτών των ειδών θαλάσσιας ανεμώνης είναι, πως παρουσιάζουν ασεξουαλική αναπαραγωγή, η οποία δημιουργεί τη δυνατότητα να ελεγχθεί η απόδοση γενετικά πανομοιότυπων κλώνων. Όσον αφορά το δεύτερο πείραμα, οι κλώνοι αυτοί, θα πρέπει να διαμοιραστούν σε διαφορετικά θερμικά περιβάλλοντα, ούτως ώστε να μελετηθεί η επιγενετική επίπτωση της θερμοκρασιακής προσαρμογής<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup> Στο σημείο αυτό θα ήταν καλό να υπενθυμίσουμε, ότι η παρούσα εργασία (πρωτόκολλο πειραμάτων) αποτελεί μέρος μίας παγκόσμιας έρευνας. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν είδη θαλάσσιας ανεμώνης τα οποία να μπορούν να βρεθούν σε διάφορα – πολλαπλά θαλάσσια οικοσυστήματα.

<sup>3</sup> Βλ. Grosholz 2001

## **Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή**

### **1.1.: Θερμικά Καθεστώτα**

Στη σημερινή εποχή εμφανίζεται η αντίληψη για την ύπαρξη συγκεκριμένων γενοτύπων στους γηγενείς πληθυσμούς των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, τα οποία διαφέρουν κατά πολύ από τους γενοτύπους άλλων οικοσυστημάτων όσον αφορά τις δυνατότητες της μορφολογίας, της φυσιολογίας, της συμπεριφοράς ή της ιστορίας της ζωής τους<sup>4</sup>.

Οι μελέτες που γίνονται βασιζόμενες στη φυσιολογία, μπορούν να βοηθήσουν στην πρόβλεψη των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής. Κάτι τέτοιο καθίσταται εφικτό, με τον καθορισμό των ειδών τα οποία ζουν κοντύτερα στα ανώτατα όρια της θερμικής τους αντοχής, με τον εντοπισμό των φυσιολογικών συστημάτων που θέτουν αυτά τα όρια, και με τον τρόπο με τον οποίο τα είδη διαφέρουν στην ικανότητα εγκλιματισμού τους, ως παράγοντα ρύθμισης της θερμικής τους αντοχής.

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ασπόνδυλα του ίδιου γένους, τα οποία βρίσκονταν σε θερμικά στρεσογόνο βραχώδες παλιρροιακό περιβάλλον, έδειξαν πως γένη τα οποία έχουν προσαρμοστεί σε θερμά περιβάλλοντα, είναι περισσότερο πιθανό να επέλθει εξαφάνιση του τοπικού πληθυσμού, καθώς η αντοχή τους σε απότομες αυξήσεις της θερμοκρασίας κυμαίνεται πολύ κοντά στην φυσιολογική, για αυτά, θερμοκρασία. Επομένως, η ικανότητά τους να προσαρμοστούν σε υψηλές θερμοκρασίες είναι εξαιρετικά περιορισμένη<sup>5</sup>. Το ίδιο, φυσικά, συμβαίνει και σε πληθυσμούς οι οποίοι έχουν εγκλιματιστεί σε περιβάλλοντα με χαμηλή θερμοκρασία.

Τα παλιρροιακά ζώα αποτελούν εξαιρετικό ερευνητικό υλικό, καθώς το θερμικό στρες μπορεί να είναι οξύ, σε βραχώδη παλιρροιακά περιβάλλοντα. Η κλιματική αλλαγή θεωρείται λοιπόν ως καθοριστικός παράγοντας της ύπαρξης των

---

<sup>4</sup> Βλ. Kawecki & Ebert 2004

<sup>5</sup> Somero 2010 The journal of experimental biology, “The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’”

γεωγραφικών και κάθετων σχεδίων κατανομής καθώς επίσης και της αλλαγής στο βιογεωγραφικό εύρος<sup>6</sup>.

Επιπρόσθετα, το μέγεθος και ο ρυθμός δραστηριότητας είναι παράγοντες που παίζουν ρόλο στη θερμική αντοχή ενός οργανισμού. Έρευνες έχουν δείξει, πως μικρά ζώα ενός είδους παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμική αντοχή από μεγάλα ζώα του ίδιου είδους, καθώς επίσης και περισσότερο δραστήριοι οργανισμοί έχουν υψηλότερη θερμική αντοχή, από ότι οι λιγότερο δραστήριοι οργανισμοί. Για το λόγο αυτό, οι εξαφανίσεις που μπορεί να πραγματοποιηθούν εξαιτίας της υπερθέρμανσης του πλανήτη, είναι εξαιρετικά πιθανό να οδηγήσουν σε αλλαγές της λειτουργίας των οικοσυστημάτων εξαιτίας της αλλαγής του μεγέθους και της δραστηριότητας των διασωθέντων ειδών<sup>7</sup>.

Το θερμικό στρες διαφέρει μεταξύ περιοχών διαφορετικού γεωγραφικού πλάτους. Αυτό υφίσταται ως αποτέλεσμα της διάδρασης μεταξύ των θερμοκρασιών «per se» και του χρόνου του παλιρροιακού κύκλου<sup>8</sup>.

---

6

- Barry et al. 1995 Science, “Climate – related, long – term faunal changes in a California rocky intertidal community”
- Gilman et al. 2006 Proc. Natl. Acad. Sci., “Variation in the sensitivity of organismal body temperature to climate change over local and geographic scales”
- Helmuth et al. 2002 Science, “Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress”
- Helmuth et al. 2006 Ecol. Monogr., “Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone: implications for climate change”
- Helmuth 2009 J. Exp. Biol., “From cells to coastlines: how can we use physiology to forecast the impacts of climate change?”
- Somero 2002 Integr. Comp. Biol., “Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and cost of living”

<sup>7</sup> Peck et al. 2009 Polar Biol., “Lack of acclimation in *Ophionotus victoriae*: brittle stars are not fish”

8

- Helmuth et al. 2002 Science, “Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress”

Η θερμική αντοχή μπορεί να τροποποιηθεί μέσω του εγκλιματισμού. Για το λόγο αυτό, είναι εξαιρετικά σημαντικό να εξετασθεί το πώς οι διαφορετικοί οργανισμοί, οι οποίοι όμως ανήκουν στο ίδιο γένος, μπορούν να συγκριθούν βάσει των ικανοτήτων τους να βελτιώνουν τη θερμική αντοχή, όταν εγκλιματίζονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Τα είδη των ζώων διαφέρουν εξαιρετικά απέναντι στο ποσοστό του κινδύνου που αντιμετωπίζουν από την υπερθέρμανση του πλανήτη. Η τρωτότητα των οργανισμών στην κλιματική αλλαγή συνδέεται και με τον διαφορετικό ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας, ο οποίος παρατηρείται σε διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη. Οι υψηλότεροι ρυθμοί αύξησης της θερμοκρασίας παρατηρούνται σε υψηλά γεωγραφικά πλάτη, επομένως τα είδη της Αρκτικής και της Ανταρκτικής, τα οποία συνεχώς πλησιάζουν τα θερμικά τους όρια, είναι εξαιρετικά πιθανό να αποτελέσουν τα πρώτα είδη τα οποία θα υποστούν σοβαρά θερμικά στρες εξαιτίας της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Τα είδη αυτά, θα έχουν ελάχιστο χρόνο προσαρμογής στις νέες συνθήκες και δεν θα καταφέρουν να περάσουν σε στάδιο προσαρμοστικής εξέλιξης (του είδους τους)<sup>9</sup>.

Οι θερμικές διαβαθμίσεις στους ωκεανούς, όμως, δεν εμφανίζονται μόνο σε μεγάλου μεγέθους κλίμακες, αλλά και σε μικρού μεγέθους οικοσυστήματα με πληθυσμούς οι οποίοι έχουν προσαρμοστεί στις συνθήκες της εκάστοτε περιοχής<sup>10</sup>. Πάνω σε αυτή ακριβώς την παραδοχή βασίζεται και η παρούσα έρευνα, καθώς μεταξύ άλλων προσπαθεί να διαπιστώσει, εάν όντως η μεγάλη διαφοροποίηση της θερμοκρασίας της θάλασσας σε παράκτια οικοσυστήματα δεκάδων εκατοντάδων χιλιομέτρων, επηρεάζει τις διαφοροποιήσεις της γενετικής προσαρμογής μεταξύ ασπόνδυλων οργανισμών.

---

- Helmuth et al. 2006 Ecol. Monogr., “Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone: implications for climate change”

- Helmuth 2009 J. Exp. Biol., “From cells to coastlines: how can we use physiology to forecast the impacts of climate change?”

<sup>9</sup> Somero 2010 The journal of experimental biology, “The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’”

<sup>10</sup> Βλ. Palumbi 2004 και Levin 2006



## 1.2.: Είδη ξενιστές

Τα ξενικά είδη για ένα οικοσύστημα είναι τα ζώα εκείνα, τα οποία εγκαθίστανται σε περιοχές εκτός των οικοσυστημάτων στα οποία συνήθως συναντώνται<sup>11</sup>. Οι βιολογικές εισαγωγές (biological introductions) μπορούν να έχουν ανθρωπογενή αίτια, είτε να προκαλούνται από αλλαγές στην ποικιλία των ειδών<sup>12</sup>. Στις ημέρες μας, κυριαρχούν τα ανθρωπογενή αίτια. Συνήθως εισαγωγές ξενικών ειδών, οι οποίες προκαλούνται από τον άνθρωπο, δεν γίνονται σκόπιμα. Τα ξενικά είδη εισέρχονται ανθρωπογενώς σε ένα θαλάσσιο οικοσύστημα, μέσω του θαλασσέρματος και των αποβλήτων των πλοίων, μέσω των υπολειμμάτων των δεξαμενών των πλοίων και μέσω της διάνοιξης θαλάσσιων καναλιών. Τον τελευταίο αιώνα έχει εμφανιστεί ραγδαία αύξηση της εισχώρησης ξενικών ειδών σε θαλάσσια οικοσυστήματα, και αυτό οφείλεται κυρίως στην παγκοσμιοποίηση των οικονομιών και στην αντιστοίχως ανάλογη αύξηση της ναυτιλιακής δραστηριότητας. Με τη μεταφορά των ξενικών ειδών μέσω των πλοίων, τα ζώα αυτά υπόκεινται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες<sup>13</sup>. Για το λόγο αυτό, τα είδη τα οποία επιβιώνουν από αυτή τη διαδικασία μεταφοράς, παρουσιάζουν μεγαλύτερες αντοχές και αντιστάσεις, από ότι οι γηγενείς πληθυσμοί<sup>14</sup>.

---

<sup>11</sup>

- Craig 2010 Marine Biology, “Pattern versus process: broadening the view of marine invasive species”

- Eno et al. 1997 Joint Nature and Conservation Committee, Peterborough, “Non-native Marine Species in British Waters: A Review and Directory”

<sup>12</sup>

- Ruiz et al. 1997 Oxford Journals, “Global Invasions of Marine and Estuarine Habitats by Non-Indigenous Species: Mechanisms, Extent, and Consequences”

- Sorte et al. 2010 Global Ecology and Biogeography, “Marine range shifts and species introductions: comparative spread rates and community impacts”

<sup>13</sup> Οι συνθήκες αυτές ποικίλουν και αφορούν από αλατότητα και θερμοκρασία έως και μόλυνση.

<sup>14</sup>

- Carlton 1987 Bulletin of Marine Science, “Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean”

Σύμφωνα με τον κανόνα των «10», των Williamson και Fitter (1996), το 10% των ειδών που μεταφέρονται από τα πλοία καταφέρνει να εισαχθεί σε ένα οικοσύστημα και μόνο το 10% αυτών καταφέρνει να δράσει ξενικά<sup>15</sup>. Παρ'όλα ταύτα, μία επιτυχημένη «εισβολή» ενός ξενιστή δεν βασίζεται μόνο στην φυσιολογία του είδους, αλλά και στο περιβάλλον του. Μία επιτυχημένη εισβολή ξενιστών είναι εφικτή, μόνο όταν υπάρχει το οικολογικό κενό, το οποίο θα μπορούσε να την υποστηρίξει<sup>16</sup>.

---

- Godwin 2005 “Maritime Activities as a Mechanism for Introducing Marine Alien Species: Issues and Management”. In: Godwin, L. S. (Ed.), Hull fouling as a mechanism for marine invasive species introductions. In Proceedings of a workshop on current issues and potential management strategies.

- Gollasch et Leppakoski 1999 Nordic Council of Ministers, “Initial risk assessment of alien species in Nordic coastal waters”

- Leppakoski et al. 2002 Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, “The Baltic - a sea of invaders”

- Reise et al. 1999 Helgoland Marine Research, “Introduced marine species of the North Sea coasts”

- Ruiz et al. 1997 Oxford Journals, “Global Invasions of Marine and Estuarine Habitats by Non-Indigenous Species: Mechanisms, Extent, and Consequences”

- Wolff 1999 Helgoland Marine Research, “Exotic invaders of the meso-oligohaline zone of estuaries in the Netherlands: why are there so many?”

15

- Boudouresque et Velaque 2002 Marine pollution bulletin, “Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes”

- Ruiz et al. 1997 Oxford Journals, “Global Invasions of Marine and Estuarine Habitats by Non-Indigenous Species: Mechanisms, Extent, and Consequences”

16

- Carriker 1992 Journal of Shellfish Research, “Introductions and transfers of molluscs: risk considerations and implications”

- Eno et al. 1997 Joint Nature and Conservation Committee, “Non-native Marine Species in British Waters: A Review and Directory”

- Olenin et Daunys 2005 NATO Science Series - Earth and Environmental Series, “Invaders in suspension-feeder systems: Variations along the regional environmental gradient and similarities between large basins. In Dame R. & Olenin, S. (Eds.): The comparative roles of suspension feeders in ecosystems”

Μία από τις μεγαλύτερες ανησυχίες αποτελεί ο φόβος για εξαφάνιση γηγενών πληθυσμών, μέσω του ανταγωνισμού τους με τα ξενικά είδη<sup>17</sup>. Οι ξενιστές μπορούν να μεταβάλλουν άρδην τις δομές των οικοσυστημάτων και μπορούν να έχουν σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στη λειτουργία τους<sup>18</sup>.

### 1.3.: Τα κατάλληλα ζώα για το πείραμα

Τα καταλληλότερα ζώα για αυτή την έρευνα είναι οι θαλάσσιες ανεμώνες μικρού μεγέθους, οι οποίες θεωρούνται ως είδη ξενιστές για τα περισσότερα ερευνητικά κέντρα που συμμετέχουν στο πρόγραμμα, και οι οποίες τείνουν να ανταπεξέρχονται εξαιρετικά καλά σε ταραγμένα οικοσυστήματα, όπως είναι τα λιμάνια. Επιπλέον, τα είδη των ανεμώνων δείχνουν συχνά μεγάλα ποσοστά ασεξουαλικής αναπαραγωγής.

---

- Ruesink et al. 2005 Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, “Introduction of non-native oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications”

- Wolff 1999 Helgoland Marine Research, “Exotic invaders of the meso-oligohaline zone of estuaries in the Netherlands: why are there so many?”

<sup>17</sup>

- Briggs 2010 Marine Biology, “Marine biology: the role of accommodation in shaping marine biodiversity”

- Craig 2010 Marine Biology, “Pattern versus process: broadening the view of marine invasive species”

- Gurevitch et Padilla 2004 Trends in Ecology & Evolution, “Are invasive species a major cause of extinctions?”

- Wolff 1999 Helgoland Marine Research, “Exotic invaders of the meso-oligohaline zone of estuaries in the Netherlands: why are there so many?”

<sup>18</sup>

- Occhipinti – Ambrogi et Galil 2010 Advances in Oceanography and Limnology, “Marine alien species as an aspect of global change”

- Olenin et Daunys 2005 NATO Science Series - Earth and Environmental Series, “Invaders in suspension-feeder systems: Variations along the regional environmental gradient and similarities between large basins. In Dame R. & Olenin, S. (Eds.): The comparative roles of suspension feeders in ecosystems”

- Ruiz et al. 1997 Oxford Journals, “Global Invasions of Marine and Estuarine Habitats by Non-Indigenous Species: Mechanisms, Extent, and Consequences”

Πρωτόκολλα πειραμάτων θερμικής αντοχής και επιγενετικών πειραμάτων σε θαλάσσιες ανεμώνες

Για τις ανάγκες του πειράματος θα πρέπει να συλλεχθούν τουλάχιστον τρία είδη που να είναι κατάλληλα για τις ανάγκες των πειραμάτων, ούτως ώστε να καταστεί σίγουρο το γεγονός, ότι τουλάχιστον τα δύο από τα τρία είδη θα ανταπεξέλθουν στις εργαστηριακές συνθήκες.

Για τον εντοπισμό και τη συλλογή των ανεμώνων, θα πρέπει να γίνει πρώτα μία μελέτη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, καθώς επίσης θα πρέπει να πραγματοποιηθεί επαφή και με υπεύθυνους ερευνητές – καθηγητές. Επίσης, καλό θα ήταν να ερωτηθούν και δύτες, οι οποίοι να γνωρίζουν καλά την περιοχή από την οποία θα συλλεχθούν τα ζώα, για την αφθονία των ανεμώνων στην περιοχή και για τα ήδη τα οποία υπάρχουν. Οι περιοχές συλλογής θα πρέπει να είναι κοντά στο εργαστήριο, αλλά να απέχουν μεταξύ τους περίπου 10 – 15m, ούτως ώστε να αποφευχθεί η συλλογή κλώνων.

Μόνο ανεμώνες οι οποίες βρίσκονται σε υποπαλιρροιακές περιοχές θα πρέπει να συλλεχθούν για το πείραμα της θερμικής αντοχής. Όλος ο υπόλοιπος εξοπλισμός που μπορεί να καταστεί αναγκαίος, εξαρτάται στις συνθήκες του κάθε ερευνητικού σταθμού.

Η δειγματοληψία θα πρέπει να ξεκινήσει όσο το δυνατόν γρηγορότερα από την ημέρα εκκίνησης του πειράματος. Επίσης, θα ήταν χρήσιμη η συζήτηση με ειδήμονες για το πότε είναι η καλύτερη στιγμή για τη συλλογή των ζώων, καθώς υπάρχουν είδη ανεμώνης που είναι νυχτόβια.

Τα μέρη από όπου θα πραγματοποιηθεί η συλλογή των ανεμώνων, θα πρέπει να ερευνηθούν πριν την ημέρα της συλλογής των ανεμώνων, για να ελεγχθεί η ύπαρξη και ο πληθυσμός των ανεμώνων.

Αφού πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των ειδών των ανεμώνων που βρέθηκαν στα σημεία συλλογής, η συγκομιδή τους θα πρέπει να γίνει τυχαία. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη συλλογή των ανεμώνων, υπάρχει στη συνέχεια της παρούσας εργασίας, συγκεκριμένο υποκεφάλαιο (Κεφ.: 3.4.).

## **Κεφάλαιο 2: Μεταβλητές – παράμετροι**

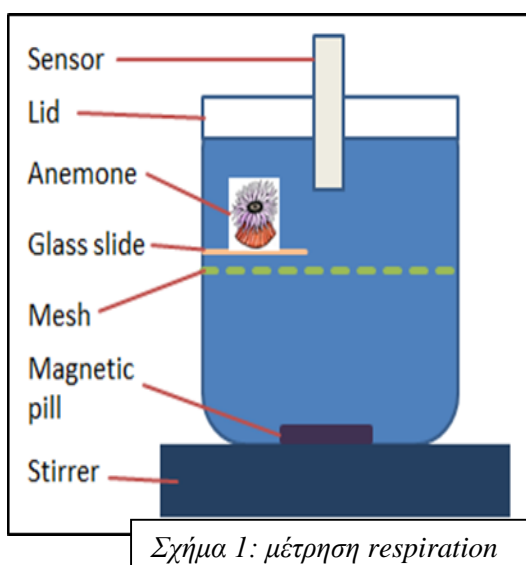
### **2.1.: Response variables**

Πολλές είναι εκείνες οι response variables (πλέον θα ονομάζονται μεταβλητές) οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να εκτιμηθεί η δυνατότητα των θαλάσσιων ανεμώνων να ανταπεξέλθουν σε διαφορετικά θερμικά καθεστάτα. Αυτές οι μεταβλητές θα πρέπει, πρωταρχικά, να βοηθούν στον εντοπισμό του εύρους της θερμικής αντοχής του κάθε είδους ανεμώνης που έχει συλλεχθεί [επί παραδείγματι, το θερμικό εύρος κατά το οποίο ένα είδος ανεμώνης παρουσιάζει αναπαραγωγική ικανότητα (fitness)]. Επιπρόσθετα, οι μεταβλητές αυτές θα πρέπει να βοηθούν στον καθορισμό της τελικής θερμοκρασίας του πειράματος (παραδείγματος χάριν, η θερμοκρασία κατά την οποία η ανεμώνη σταματά να δρα κανονικά. Παρόλα ταύτα, είναι αρκετά δύσκολο να καθοριστεί το πώς ορίζει κανείς την κανονική δράση μίας ανεμώνης. Θα πρέπει εκ των προτέρων να ορισθούν τα χαρακτηριστικά τα οποία θεωρούνται ως ενδείξεις κανονικής δράσης). Κάθε μεταβλητή που θα αναφερθεί παρακάτω θα μπορούσε να υποδιαιρεθεί σε καλή απόδοση και κακή απόδοση. Ένα παράδειγμα για αυτό θα μπορούσε να είναι το εξής: καταγραφή της θερμοκρασίας κατά την οποία οι ανεμώνες σταματούν να παρουσιάζουν ασεξουαλική αναπαραγωγή. Αυτή η συγκεκριμένη θερμοκρασία, θα μπορούσε να αποτελέσει τη λήξη του φάσματος της κανονικής δράσης μίας ανεμώνης. Υπάρχουν τρεις κύριες μεταβλητές (γεννητικότητα, επιβίωση, habitus) οι οποίες θα πρέπει να εξετάζονται σε κάθε περίπτωση. Οι υπόλοιπες αποτελούν επιπρόσθετες μεταβλητές οι οποίες θα πρέπει ιδανικά, αλλά όχι απαραίτητα, να εξετάζονται. Η σειρά με την οποία αναφέρονται οι μεταβλητές είναι τέτοια, αντικατοπτρίζοντας τη σχετικότητά τους με αυτό το πείραμα.

Ο ρυθμός αναπαραγωγής είναι η σημαντικότερη μεταβλητή. Υπολογίζεται ως ο αριθμός αναπαραγωγής ανά πειραματικό δοχείο ανά μονάδα χρόνου. Με την καταγραφή κάθε αναπαραγωγής, καθίσταται εφικτός και ο υπολογισμός του ενδιάμεσου χρόνου μεταξύ κάθε αναπαραγωγικής διαδικασίας. Η κατάσταση κάθε ανεμώνης ξεχωριστά (ζωντανή/νεκρή) θα πρέπει λοιπόν να ερευνάται καθημερινά. Οι ακριβείς μεταβλητές οι οποίες θα πρέπει να υπολογίζονται είναι οι εξής: α) χρόνος

αναπαραγωγής (σε ημέρες), β) χρόνος από την τελευταία αναπαραγωγή (σε ημέρες), γ) κατάσταση (κατηγορίες οι οποίες θα πρέπει να επισημάνονται με 0 και 1, όπου 1 = συνέβη και 0 = δεν συνέβη) και δ) αριθμός απογόνων (κατά τη διάρκεια του πειράματος). Κατά τη διάρκεια του πειράματος της θερμικής αντοχής, κάθε φορά που σημειώνεται μία αναπαραγωγική δραστηριότητα, θα απομακρύνεται από το δοχείο μία (1) (από τις δύο που θα υπάρχουν) ανεμώνη. Στην περίπτωση που οι ανεμώνες διαφέρουν σε μέγεθος, θα απομακρύνεται η μικρότερη. Η απόφαση να απομακρύνεται η μικρότερη δεν στοιχειοθετείται πάνω σε κάποια βιβλιογραφία ή σε κάποιο συγκεκριμένο πόρισμα. Είναι μία επιλογή που απλά πραγματοποιείται για το συγκεκριμένο πείραμα. Η σκέψη πίσω από αυτή τη συλλογιστική είναι, πως η μεγαλύτερη ανεμώνη γίνεται αντιληπτή ως «μητρική ανεμώνη». Στο επιγενετικό πείραμα, θα αφαιρείται η μεγάλη ανεμώνη. Εάν δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεγέθους, η επιλογή θα πρέπει να γίνεται τυχαία.

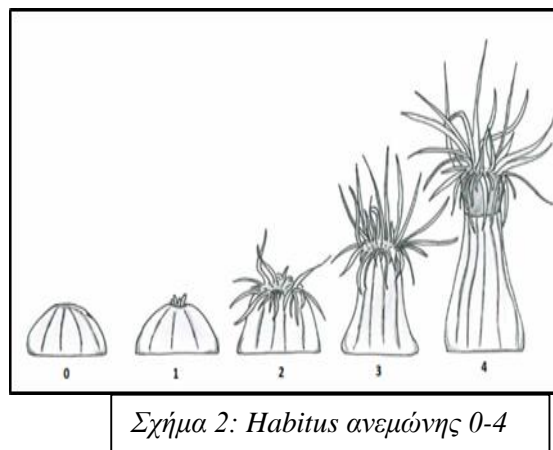
Στην περίπτωση που οι ανεμώνες δεν δείξουν ασεξουαλική αναπαραγωγή κατά την διάρκεια του θερμικού στρες, θα πρέπει, εναλλακτικά, να μετρηθεί ο ρυθμός αναπνοής (respiration rate). Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μέτρηση, θα πρέπει να δημιουργηθεί ένας αεροστεγής θάλαμος αναπνευσιομετρίας (respirometry), μέσα στον οποίο θα μεταφέρεται η ανεμώνη. Στο θάλαμο αυτό θα υπάρχει και μία μαγνητική μπίλια (βλ. σχήμα 1). Η μπίλια αυτή χρησιμεύει στη συνεχόμενη ανάδευση του νερού μέσα στο θάλαμο καθώς θα πραγματοποιείται μέτρηση της πτώσης της συγκέντρωσης οξυγόνου. Ο θάλαμος θα πρέπει να γεμίσει με θαλασσινό νερό μέχρι το καπάκι του, ούτως ώστε να μην μπορεί να αναμειχθεί οξυγόνο από τυχόν κενό με αέρα. Το καπάκι θα πρέπει να έχει μία τρύπα, για να μπορεί να εισχωρήσει ο αισθητήρας του οξύμετρου. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, ο θάλαμος αναπνευσιομετρίας θα είναι τοποθετημένος πάνω σε μηχανήμα ανάδευσης, το οποίο θα μετακινεί την μαγνητική μπίλια. Η συγκέντρωση οξυγόνου θα μετρηθεί δύο φορές. Οι δύο αυτές μετρήσεις θα πρέπει να γίνουν με διαφορά δεκαπέντε (15) λεπτών, ούτως ώστε να μπορεί να γίνει αντιληπτό το



Σχήμα 1: μέτρηση respiration

ποσοστό κατανάλωσης οξυγόνου ανά μονάδα χρόνου. Στο ενδιαμέσο των μετρήσεων αυτών, ο θάλαμος αναπνευσιομετρίας θα πρέπει να σφραγιστεί αεροστεγώς, για να αποφευχθεί η εισροή οξυγόνου. Επιπρόσθετα, το οξύμετρο θα πρέπει να καλιμπράρεται κάθε τόσο. Το ποσοστό οξυγόνου θα πρέπει να μετρηθεί σε mg/l/μονάδα χρόνου ή, εάν η συγκέντρωση είναι πολύ χαμηλή, σε µl/g/μονάδα χρόνου<sup>19</sup>. Για λόγους ανάλυσης, θα τυποποιήσουμε την κατανάλωση οξυγόνου μέσω του ξηρού βάρους μίας/κάθε ανεμώνης (mg/l/μονάδα χρόνου/ξηρό βάρος).

Το habitus των ανεμώνων είναι μία ακόμα σημαντική μεταβλητή. Κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος θα αναφερόμαστε σε πέντε (5) διαφορετικά στάδια habitus, τα οποία έχουν οριστεί για το είδος *Haliplanella lineata* από την Imke Podbielski<sup>20</sup> (βλ. σχήμα 2). Τα στάδια αυτά ποικίλουν από χαλαρή στάση με παρατεταμένα πλοκάμια (φάση 4 του σχήματος No.2) σε απόλυτη συστολή χωρίς ορατά πλοκάμια (φάση 0 του σχήματος No.2) (βλ. σχήμα 2).



Σχήμα 2: Habitus ανεμώνης 0-4

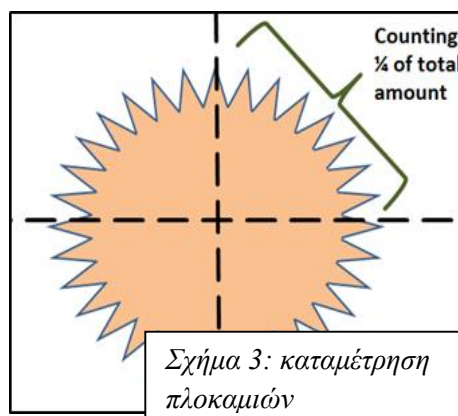
Η τρίτη και σημαντικότερη μέτρηση είναι ο ρυθμός επιβίωσης, ο οποίος, παρόμοια με τον ρυθμό αναπαραγωγής, θα συγκριθεί μεταξύ πειραματικών ομάδων μέσω της μεθόδου ανάλυσης ιστορικών συμβάντων (event history analysis). Για να επιτευχθεί αυτό, θα πρέπει να καταγραφεί η ακριβής ημέρα θανάτου κάθε ανεμώνης από τη στιγμή που θα ξεκινήσει το πείραμα. Ως θάνατος μία ανεμώνης, ορίζεται η πρώτη στιγμή κατά την οποία αυτή θα παρουσιάσει ξεκάθαρα σημάδια φθοράς/αποσύνθεσης ή εάν υπάρξει εξαφάνιση της ανεμώνης. Επιπρόσθετα, θα χρησιμοποιηθεί η σημειολογία 0 και 1 για την καταγραφή του θανάτου. Όλες οι ανεμώνες οι οποίες πέθαναν κατά τη διάρκεια του πειράματος θα παίρνουν τιμή 1 (το γεγονός του θανάτου συνέβη), ενώ οι ανεμώνες οι οποίες έχουν επιβιώσει μετά τα πέρασ του

<sup>19</sup> Zamer et Mangum 1979 Bio. Bull., “Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella Luciae* (Verrill)”

<sup>20</sup> Imke Podbielsky “Acclimation potential of the invasive sea anemone *Haliplanella lineata* (Verrill 1898) to changing salinities”, GEOMAR - Helmholtz Centre for Ocean Research, Kiel, 2014

πειράματος θα παίρνουν τιμή 0 (το γεγονός του θανάτου δεν συνέβη). Για όλες τις ανεμώνες που επιβίωσαν του πειράματος, το δεδομένο «χρόνος θανάτου» θα είναι ο συνολικός χρόνος του πειράματος, ενώ η τιμή τους θα είναι προφανώς 0. Εάν μία ανεμώνη πεθάνει την τελευταία ημέρα του πειράματος, το δεδομένο «χρόνος θανάτου» θα είναι μεν ίσο με τη διάρκεια ολόκληρου του πειράματος, όμως θα πάρει τιμή 1.

Μία μεταβλητή με μικρότερη προτεραιότητα είναι η καταμέτρηση του αριθμού των πλοκαμιών των ανεμώνων. Η μέθοδος, για αυτό, είναι ο καθορισμός του αριθμού των πλοκαμιών μέσω μίας φωτογραφίας της ανεμώνης, η οποία θα πρέπει να έχει τραβηχτεί από το ακριβώς επάνω μέρος αυτής. Αυτή η



μεταβλητή μπορεί να πραγματοποιηθεί, εάν χωριστεί η ανεμώνη (στη φωτογραφία που θα έχει τραβηχτεί) σε τέσσερα (4) ίσα τμήματα. Αφού γίνει αυτός ο χωρισμός, μετρούνται τα πλοκάμια του ενός τετάρτου και μετά πολλαπλασιάζονται επί τέσσερα (αριθμός πλοκαμιών  $\frac{1}{4} \times 4$ ) (βλ. σχήμα 3). Αυτή η μέθοδος θα πρέπει πρώτα να αξιολογηθεί προσεκτικά κατά το πιλοτικό πείραμα, ούτως ώστε να βεβαιωθεί η εγκυρότητά της.

Η βιομάζα θα μπορούσε να αποτελέσει ακόμα μία παράμετρο για να γίνει αξιολόγηση της ανάπτυξης μίας ανεμώνης. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η παράμετρος, θα καταγραφεί το υγρό βάρος (wet weight) των ανεμώνων (σε mg) κατά την αρχή του πειράματος. Αυτό θα καταστεί εφικτό με το προσεκτικό στέγνωμα της επιφάνειας όλων των ανεμώνων με ένα κομμάτι χαρτί και αφού στεγνώσουν να ζυγιστούν. Επειδή οι ανεμώνες θα είναι προσκολλημένες σε μία επιφάνεια (π.χ. κομμάτι γυαλί), το βάρος κάθε τέτοιας επιφάνειας θα πρέπει να μετράται επιπρόσθετα. Η ίδια ακριβώς διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί και ακριβώς στο τέλος του πειράματος. Το στεγνό βάρος (dry weight) των ανεμώνων μπορεί να μετρηθεί μόνο κατά το τέλος του πειράματος, γιατί η διαδικασία του στεγνώματος των ζώων θα είναι υποχρεωτικά μοιραία. Οι ανεμώνες θα στεγνώσουν σε ηλεκτρικό στεγνωτήριο (ή φούρνο) στους 72°C για περίπου 24 – 48 ώρες, μέχρις ότου το βάρος σταθεροποιηθεί. Εάν το βάρος είναι σταθερό, σημαίνει πως έχει εξατμισθεί όλο το νερό και παραμένει μόνο η οργανική ύλη. Ο υπολογισμός του ξηρού βάρους είναι



αναγκαίως, ούτως ώστε να σταθεροποιηθούν κάποιες μεταβλητές για τη στατιστική ανάλυση.

Η κινητικότητα της ανεμώνης μέσα στο δοχείο θα μπορούσε να αποτελέσει μία ακόμα μεταβλητή. Η κινητικότητα επηρεάζεται από τις αυξανόμενες θερμοκρασίες. Μπορεί να υπολογισθεί με την σημείωση της θέσης της ανεμώνης (έξω από το διαφανές δοχείο στο οποίο θα βρίσκεται) σε θέσεις  $t_1$  και  $t_2$ , οι οποίες μπορεί να απέχουν μεταξύ τους 3 ώρες. Μετά το πέρας του ορισμένου χρόνου (εδώ 3 ώρες), θα μετρηθεί η μικρότερη απόσταση (δηλαδή ευθεία γραμμή) ανάμεσα στις δύο αυτές θέσεις. Η απόσταση αυτή θα αποτελέσει την ελάχιστη απόσταση που κάλυψε η ανεμώνη και θα μετρηθεί είτε σε mm είτε σε cm. Η διαδικασία αυτή θα πραγματοποιηθεί για όλες τις ανεμώνες, αρκετές φορές, κατά τη διάρκεια του πειράματος. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να αφαιρούνται τα σημάδια που γίνονται μετά το πέρας κάθε μέτρησης, για αποφυγή κάποιου μπερδέματος/λάθους.

Κάποια είδη ανεμώνης, όπως για παράδειγμα η *Anemonia alicemartinae*<sup>21</sup>, είναι γνωστά για την αποκόλλησή τους από την επιφάνεια στην οποία βρίσκονται προσκολλημένες, όταν εκτεθούν σε περιβαλλοντικό στρες. Ο χρόνος που χρειάζεται για την αποκόλληση εξαρτάται από το είδος της επιφάνειας προσκόλλησης. Παρ'όλα ταύτα, στο συγκεκριμένο πείραμα, δεν λαμβάνονται υπ'όψη τα διαφορετικά είδη επιφανειών προσκόλλησης, καθώς θα χρησιμοποιηθούν μόνο γυάλινα πλακίδια, πάνω στα οποία θα προσκολληθούν οι ανεμώνες και τα οποία θα τοποθετηθούν στα πειραματικά δοχεία. Αυτή η μεταβλητή λοιπόν,, ισούται με τον ρυθμό αναπαραγωγής και την επιβίωση.

Μία ακόμα μεταβλητή, είναι ο χρόνος που χρειάζεται μία ανεμώνη για να αναδιπλωθεί μετά από ένα ερέθισμα. Για να μελετηθεί αυτή η μεταβλητή, θα πρέπει να σπρωχθεί/σκουντηθεί προσεκτικά η ανεμώνη με ένα αντικείμενο, ούτως ώστε να συσταλεί τελείως. Αφού συμβεί αυτό, θα πρέπει να μετρηθεί ο χρόνος που θα χρειαστεί η ανεμώνη να χαλαρώσει και να αναδιπλωθεί. Αυτή η μεταβλητή θα μετρηθεί σε δευτερόλεπτα ή λεπτά.

---

<sup>21</sup> Lopez et al. 2013 Revista chilena de historia natural, "Potential dispersal mechanisms of the cryptogenic anemone, *Anemonia alicemartinae*"

Η τελευταία μεταβλητή που θα μπορούσε να υπολογισθεί είναι η αντοχή της ανεμώνης σε έντονο θερμικό στρες. Αυτή η μεταβλητή θα μπορούσε να μετρηθεί μόνο κατά τη διάρκεια του επιγενετικού πειράματος. Μετά από κάθε αναπαραγωγή, θα αφαιρείται μία ανεμώνη από το δοκιμαστικό δοχείο και θα εκτίθεται σε έντονο θερμικό στρες. Για να επιτευχθεί αυτό, θα αυξάνεται συνεχώς η θερμοκρασία στο λουτρό νερού, με συγκεκριμένο ρυθμό και θα καταγράφεται η θερμοκρασία κατά την οποία η ανεμώνη θα συσταλεί τελείως.

## 2.2.: Ποιότητα νερού

Οι τιμές συγκέντρωσης (στο νερό του πειράματος) του αμμωνίου, του νιτρικού, της αλατότητας και του pH, θα πρέπει να μετρώνται μία φορά την εβδομάδα. Καθώς η θερμοκρασία είναι εξαιρετικά σημαντική για τη διεξαγωγή του πειράματος, θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον μία φορά στην αρχή κάθε ημέρας.

### 2.2.1.: Αμμώνιο (NH<sub>4</sub>)

Συνιστάται η χρήση του ειδικού κουτιού για έλεγχο αμμωνίου που παρασκευάζεται από την εταιρεία Tetra και το οποίο είναι κατάλληλο τόσο για θαλασσινό όσο και για νερό βρύσης. Σύμφωνα με τις οδηγίες που συνοδεύουν το κουτί αυτό, η συνολική συγκέντρωση του αμμωνίου στο νερό θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από 0.05 mg/l και επομένως δεν θα πρέπει να ανιχνεύεται από το τεστ αμμωνίου (το οποίο καταγράφει τιμές ανώτερες του 0.05 mg/l).

Εφαρμογή του τεστ αμμωνίου:

- 1) Βρέξτε το ειδικό φιαλίδιο με το υπό εξέταση νερό. Μετά γεμίστε με το εξεταζόμενο νερό το φιαλίδιο, μέχρι το ύψος της ένδειξης των 5ml. Σημαντικό: η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20oC και 30oC.
- 2) Τοποθετείστε στο φιαλίδιο 14 σταγόνες του πρώτου υγρού αντίδρασης (το οποίο βρίσκεται σε ειδικό μπουκαλάκι μέσα στο κουτί).
- 3) Κλείστε το φιαλίδιο και ανακινήστε ελαφρά.

- 4) Ανοίξτε το φιαλίδιο και προσθέστε 7 σταγόνες από το δεύτερο υγρό αντίδρασης.
- 5) Κλείστε το φιαλίδιο και ανακινήστε ελαφρά.
- 6) Ανοίξτε το φιαλίδιο και προσθέστε 7 σταγόνες από το τρίτο υγρό αντίδρασης.
- 7) Κλείστε το φιαλίδιο και ανακινήστε ελαφρά.
- 8) Αφήστε το φιαλίδιο ανέπαφο για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9) Ανακινήστε το φιαλίδιο ελαφρά και συγκρίνετε το χρώμα του υγρού με την ειδική κάρτα που υπάρχει μέσα στο κουτί του τεστ. Διαβάστε την τιμή, κρατώντας το φιαλίδιο περίπου 1cm μακριά από την άσπρη περιοχή της κάρτας.
- 10) Μετά από κάθε τεστ, ξεπλύνετε το φιαλίδιο καλά με νερό βρύσης.

### 2.2.2.: Νιτρικό (NO<sub>2</sub>)

Για τη μέτρηση του νιτρικού συνίσταται επίσης η χρήση ενός ειδικού κουτιού για τη μέτρηση του νιτρικού από την εταιρεία Tetra, το οποίο να είναι κατάλληλο και για θαλασσινό και για φρέσκο νερό. Σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης του κουτιού, η συγκέντρωση νιτρικού θα πρέπει να βρίσκεται κάτω από 0.3 mg/l.

Εφαρμογή του τεστ για το νιτρικό:

- 1) Βρέξτε το δοκιμαστικό φιαλίδιο με το υπό εξέταση νερό.
- 2) Γεμίστε το φιαλίδιο με το εξεταζόμενο νερό, μέχρι την γραμμή των 5ml
- 3) Προσθέστε 7 σταγόνες από το πρώτο υγρό αντίδρασης.
- 4) Κλείστε το φιαλίδιο και ανακινήστε ελαφρά.
- 5) Αφήστε ανέπαφο το φιαλίδιο για 10 δευτερόλεπτα και μετά προσθέστε 7 σταγόνες από το δεύτερο υγρό αντίδρασης.
- 6) Κλείστε το φιαλίδιο και ανακινήστε ελαφρά.
- 7) Αφήστε ανέπαφο το φιαλίδιο για 2 - 5 λεπτά.
- 8) Ανακινήστε το φιαλίδιο ελαφρά και συγκρίνετε την απόχρωση του υγρού με την ειδική καρτέλα που θα βρείτε στο κουτί.
- 9) Μετά από κάθε τεστ, ξεπλύνετε καλά το φιαλίδιο με νερό βρύσης.

### 2.2.3.: Καθαρισμός δοχείων ανεμώνων

Ο καθαρισμός θα πρέπει να γίνεται μία φορά την εβδομάδα, εκτός εάν παρατηρείται μεγάλη αύξηση διατόμων κ.α., οπότε θα πρέπει να γίνεται συχνότερα.

Για να πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός, θα χρειαστεί νερό και ένα σφουγγάρι.

Προσεκτικά, αφαιρείται το νερό στο υπό καθαρισμό δοχείο, μέχρις ότου έχει μείνει λίγο νερό για την ανεμώνη. Εν συνεχεία καθαρίζονται τα τοιχώματα του δοχείου με το σφουγγάρι, χωρίς να χρησιμοποιηθεί κάποιο απορρυπαντικό. Μετά από αυτή τη διαδικασία, αφαιρείται και το υπόλοιπο νερό και τοποθετείται εκ νέου θαλασσινό νερό στο δοχείο.

### 2.2.4.: Αλατότητα νερού

Για την μέτρηση της αλατότητας του νερού, απαιτείται ένα διαθλασιόμετρο (refractometer), απιονισμένο νερό και χαρτί ή πετσέτα.

Αρχικά χρησιμοποιείται το διαθλασιόμετρο για να μετρηθεί η αλατότητα του νερού. Η τιμή της αλατότητας θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 33‰ - 35‰, εκτός εάν η αλατότητα στο σημείο συγκομιδής των ανεμώνων είναι πολύ διαφορετική από αυτή που αναφέρεται παραπάνω. Εάν η αλατότητα του νερού είναι χαμηλότερη από την παραπάνω, τότε θα πρέπει να προστεθεί ειδικό αλάτι. Εάν η αλατότητα του νερού είναι υψηλότερη από την παραπάνω, τότε θα πρέπει να προστεθεί φρέσκο νερό.

Με ένα σταγονόμετρο, προστίθενται 2 σταγόνες του νερού των δοχείων μέσα στο πρίσμα του διαθλασιόμετρου. Εν συνεχεία θα πρέπει να κλείσει το καπάκι αυτού με προσοχή για να μην σχηματιστούν φούσκες αέρα στην επιφάνεια του υγρού. Κρατώντας το πρίσμα προς το φως, κοιτώντας μέσα από το διαθλασιόμετρο, καταγράφεται το κατά πόσο η διατομή βρίσκεται ανάμεσα στο ανώτερο (σκιασμένο) και κατώτερο (καθαρό) τμήμα του πρίσματος. Τα όρια αυτά αντιπροσωπεύουν την αλατότητα. Η μέτρηση γίνεται επί της χιλίσις (‰). Αφού τελειώσει η μέτρηση, ξεπλένεται το πρίσμα και καλύπτεται το δισκίο του με απιονισμένο νερό. Μετά στεγνώνεται με χαρτί ή πετσέτα.

### 2.2.5.: Θερμοκρασία και Οξυγόνο

Για να παρακολουθούνται η θερμοκρασία και η συγκέντρωση οξυγόνου, θα πρέπει να γίνονται τακτικές μετρήσεις. Η θερμοκρασία θα πρέπει να μετράται μία φορά την εβδομάδα. Δείγματα θερμοκρασίας θα πρέπει να λαμβάνονται από κάθε λουτρό νερού, από τις άκρες και από το κέντρο αυτού. Το οξυγόνο θα πρέπει να μετράται μία φορά την ημέρα ανά δοχείο ανεμώνης. Για να μετρηθούν η θερμοκρασία και το οξυγόνο χρησιμοποιείται το οξύμετρο. Η τιμή της θερμοκρασίας εξαρτάται από το πείραμα και το στάδιο αυτού. Η ανώτατη διαλυτότητα του οξυγόνου σε νερό πίεσης 1atm κυμαίνεται από 15 mg/L σε 0°C και 8 mg/L σε 30°C. Το εύρος αυτό αιτιολογείται καθώς, το παγωμένο νερό, μπορεί να αντέξει το διπλάσιο διαλυμένο οξυγόνο από ότι το θερμό νερό. Το ποσοστό του οξυγόνου που διαλύεται στο νερό μπορεί να μειωθεί όταν εμφανίζονται υψηλές θερμοκρασίες, υψηλή αλατότητα και μεγάλη άνοση.

Για να χρησιμοποιηθεί το οξύμετρο, θα πρέπει πρώτα να αφαιρεθεί το καπάκι ασφαλείας του αισθητήρα. Στη συνέχεια τοποθετείται ο αισθητήρας στο νερό και αναδεύεται ελαφρά. Εάν υπάρχει αντλία που ανακινεί το νερό, δεν απαιτείται και χειροκίνητη ανάδευση. Οι ενδείξεις της οθόνης του οξύμετρου μεταβάλλονται συνεχώς. Όταν σταματήσει η μεταβολή και σταθεροποιηθούν οι τιμές στην οθόνη, τότε τελειώνει και η μέτρηση. Μετά τη χρήση του οξύμετρου, ξεπλένεται ο αισθητήρας με απιονισμένο νερό ούτως ώστε να αποφευχθεί η οποιαδήποτε ζημιά που μπορεί να κάνει το αλάτι όταν στεγνώσει πάνω στον αισθητήρα. Τέλος, επανατοποθετείται το καπάκι ασφαλείας του αισθητήρα. Τα οξύμετρα θα πρέπει να καλιμπράρονται κάθε δύο εβδομάδες.

## **Κεφάλαιο 3: Το πείραμα**

### **3.1.: Σχεδιασμός πειραμάτων**

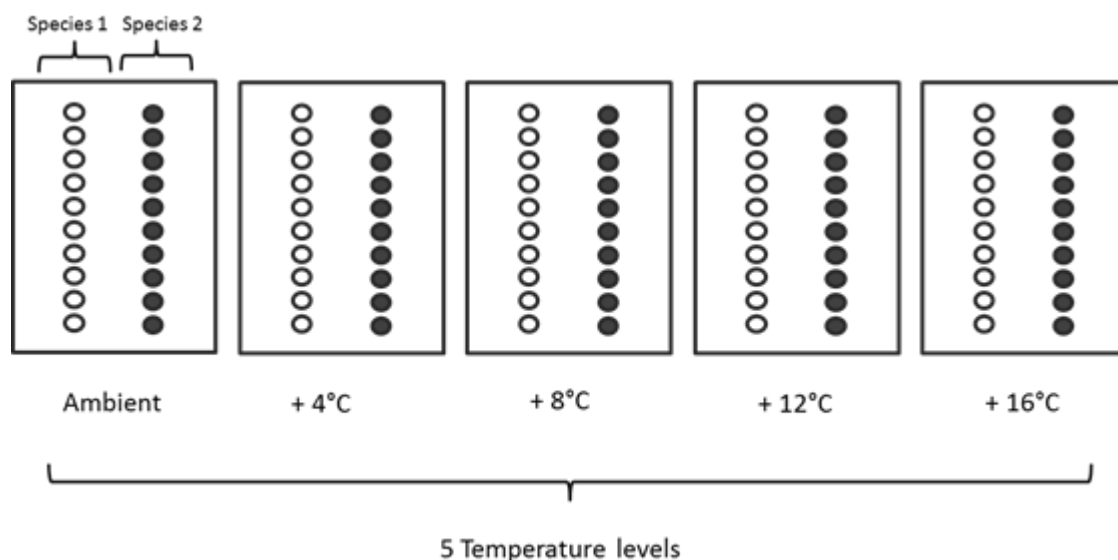
#### **3.1.1.: Γενιές των ανεμώνων**

Για να υπάρξουν ανεξάρτητα replicates σε κάθε εξεταζόμενο θερμικό καθεστώς, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανεμώνες από γενετικά διαφορετικές γενιές (genetically different lineages), οι οποίες όμως να συνδέονται με τις ανεμώνες εκείνες που συνελέγησαν από τη θάλασσα για το σκοπό του πειράματος. Για το τρέχον πείραμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν 15 replicates τα οποία να προέρχονται από αυτές τις γενιές και τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες. Για αυτό το λόγο, θα υπάρξει μεν ανεξαρτησία μεταξύ των ομάδων, αλλά και ανεξαρτησία μεταξύ των μεμονωμένων replicates. Αυτό γίνεται ούτως ώστε να μειωθεί η πιθανότητα ύπαρξης ανεξήγητης διακύμανσης στα δεδομένα. Όσο μικρότερη η διακύμανση (ει δυνατόν ακόμα και μηδενική), τόσο πιο ισχυρά θα είναι τα στατιστικά τεστ. Για κάθε μία από τις γενιές θα πρέπει να ανακτηθούν τόσες ανεμώνες όσα και τα θερμικά καθεστώτα που θα μελετηθούν (5 για τον πιλότο και 4 για το πείραμα της θερμικής αντοχής). Στην περίπτωση του επιγενετικού πειράματος, θα πρέπει να υπάρχουν μόνο 9 ανεμώνες ανά γενεά, 3 για κάθε θερμικό καθεστώς. Αυτό συμβαίνει καθώς έτσι απαιτείται από τον σχεδιασμό και τη διαδικασία διασταύρωσης μέσα στο πείραμα (η οποία εξηγείται στη συνέχεια). Οι πειραματικές μονάδες θα αποτελούνται από βάζα της τάξεως των ~0,3 lt. Και οι οποίες θα περιλαμβάνουν έκαστη 1 ανεμώνη.

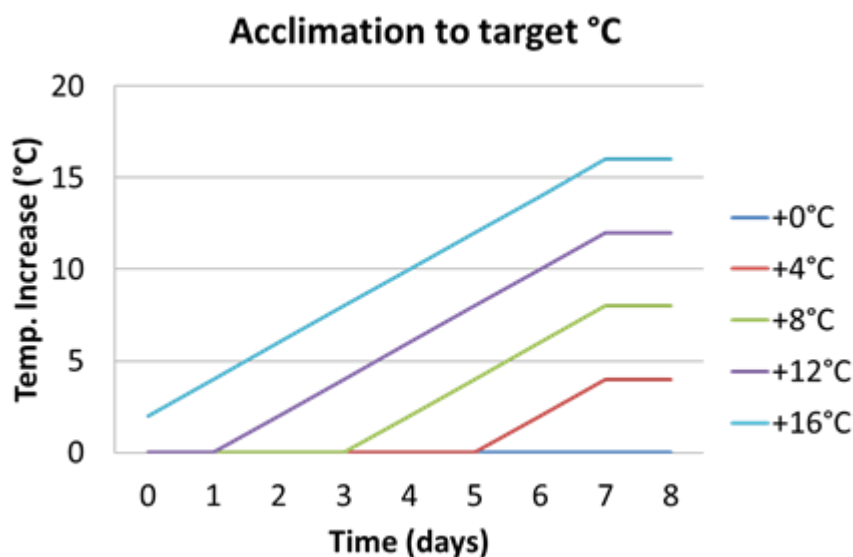
#### **3.1.2.: Πιλοτικό πείραμα**

Η πιλοτική έρευνα γίνεται με σκοπό να εξετασθεί το θερμικό εύρος κατά το οποίο οι ανεμώνες παρουσιάζουν απογόνους. Για να γίνει εφικτή η οριοθέτηση του εύρους, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ένα αρχικό πείραμα πέντε θερμικών καθεστώτων

(πilotική έρευνα), το οποίο να καλύπτει ένα εύρος θερμοκρασιών. Το κάθε καθεστώς θα πρέπει να διαφέρει από το προηγούμενό του 4oC. Η pilotική αυτή έρευνα θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε δύο διαφορετικά είδη ανεμώνων και θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν 10 ανεμώνες από κάθε είδος (σε αντίθεση με το κυρίως πείραμα στο οποίο θα χρησιμοποιηθούν 15 ανεμώνες). Τα προαναφερθέντα φαίνονται και στο παρακάτω σχήμα (βλ. σχήμα 4).



[Σχήμα 4: Η θερμοκρασία η οποία θα θεωρηθεί ως αρχική θα είναι αυτή του περιβάλλοντος. Πιο συγκεκριμένα, θα είναι ο μέσος όρος της θερμοκρασίας της επιφάνειας της θάλασσας κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (από Ιούνιο έως Αύγουστο). Εν συνεχεία θα υπάρχουν τέσσερα επιπλέον θερμικά περιβάλλοντα (+4oC, +8oC, +12oC, +16oC). Η αύξηση της θερμοκρασίας θα γίνεται ανά 2oC κάθε μέρα, ξεκινώντας με όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η αύξηση της θερμοκρασίας θα ξεκινήσει για το υψηλότερο επίπεδο θερμοκρασίας (+16oC) και θα ακολουθηθεί από το επόμενο επίπεδο (+12oC) δύο ημέρες αργότερα κ.ο.κ. Όταν όλα τα δοχεία έχουν φτάσει στα επίπεδα θερμοκρασίας για τα οποία προορίζονταν, αυτή θα θεωρηθεί και η ημέρα εκκίνησης του πειράματος. Η διάρκεια του pilotικού πειράματος θα είναι τρεις εβδομάδες].



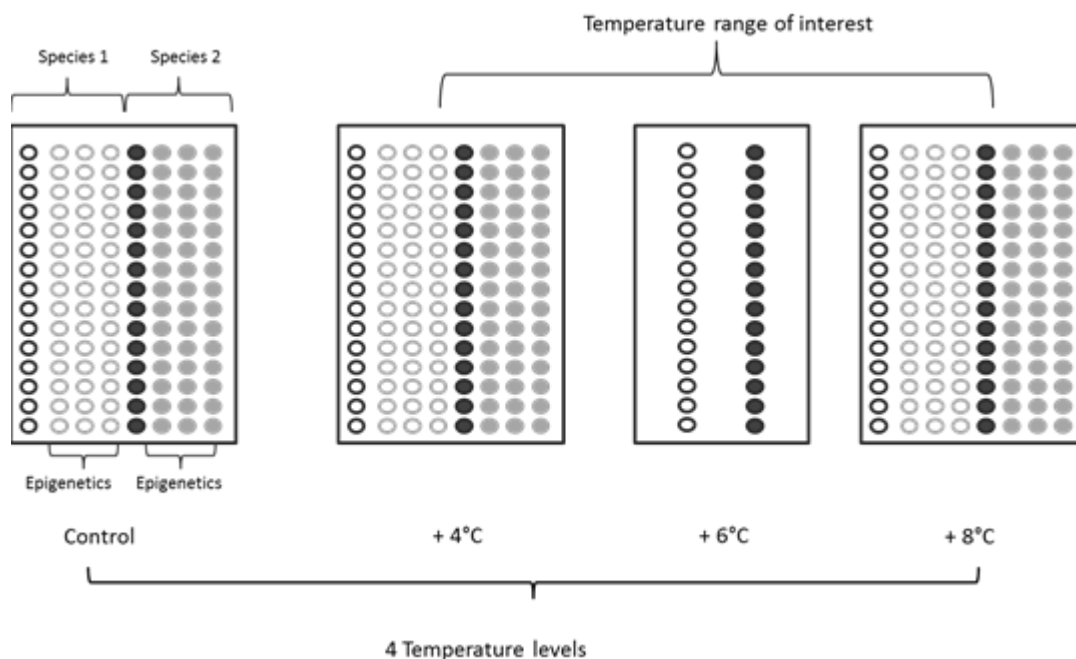
(Σχήμα 5: παράδειγμα εγκλιματισμού στις επιθυμητές θερμοκρασίες)

### 3.1.3.: Πείραμα 1: Εντοπίζοντας το εύρος του ανώτερου παραθύρου θερμικής αντοχής

Αφού έχει γίνει ο εντοπισμός του ενδιαφερόμενου θερμικού εύρους<sup>22</sup>, τότε μπορεί να ξεκινήσει ο σχεδιασμός του πειράματος της θερμικής αντοχής. Το εύρος της θερμοκρασίας για αυτό το πείραμα θα καλύπτει:  $T_1 = \text{ambient temperature}$ ,  $T_2 = \text{ambient} + X^\circ\text{C}$ ,  $T_3 = \text{ambient} + X^\circ\text{C} + 2^\circ\text{C}$  and  $T_4 = \text{ambient} + X^\circ\text{C} + 4^\circ\text{C}$  ούτως ώστε να καλύπτει μία μεγαλύτερη ανάλυση μέσα στο θερμικό εύρος που μας ενδιαφέρει (βλ. σχήμα 6). Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας πριν από την εκκίνηση του πειράματος θα είναι ο ίδιος όπως και στο πιλοτικό πείραμα και η διάρκεια αυτού θα είναι έξι εβδομάδες.

<sup>22</sup> επί παραδείγματι το εύρος ανάμεσα στο τελευταίο επίπεδο θερμοκρασίας κατά το οποίο παρατηρήθηκε αναπαραγωγή της ανεμώνης ( $T_2 = \text{ambient} + X^\circ\text{C}$ ) και στο πρώτο θερμικό επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρείται αναπαραγωγή αυτής για τρεις εβδομάδες ( $T_4 = \text{ambient} + X^\circ\text{C} + 4^\circ\text{C}$ ).





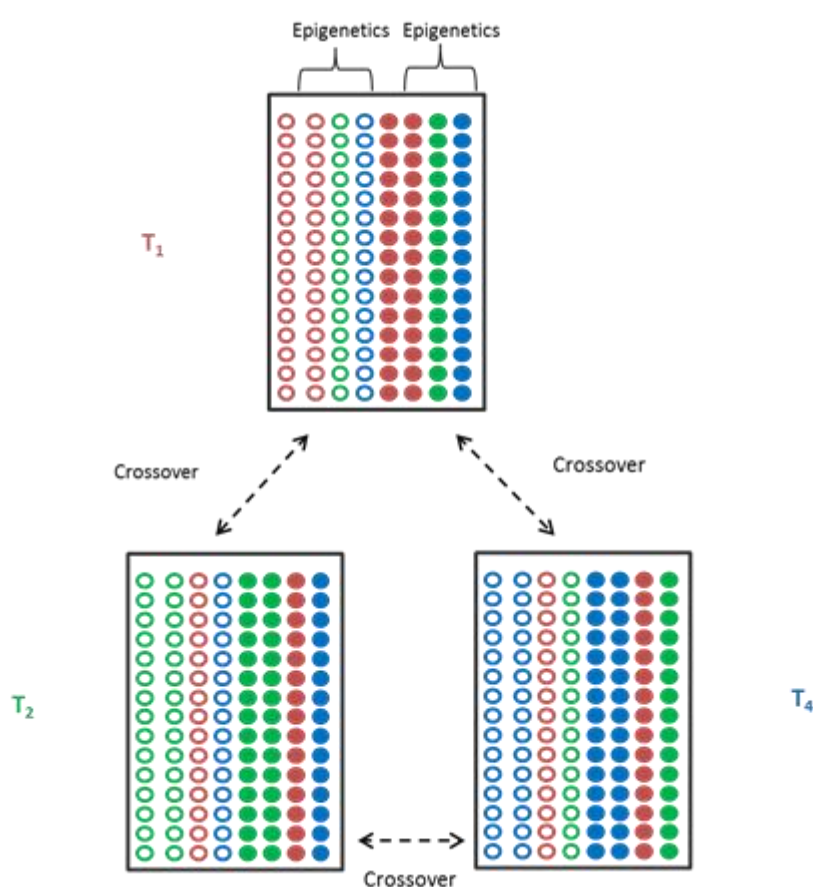
(Σχήμα 6: Στήσιμο πειράματος θερμικής αντοχής. Τα  $T_1$ ,  $T_2$  και  $T_4$  αποτελούν επίσης και μέρος του επιγενετικού πειράματος και για αυτό φαίνεται και διαφορά στον αριθμό των πειραματικών μονάδων).

### 3.1.4.: Πείραμα 2: Έλεγχος για διαγενεαλογική πλαστικότητα

Για να γίνει έλεγχος για ύπαρξη διαγενεαλογικής πλαστικότητας, η οποία ορίζεται ως ο εγκλιματισμός του απογόνου στις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται οι γονείς, ως αντίδραση στο θερμικό στρες, θα πρέπει να διεξαχθεί ένα επιπλέον πείραμα, το οποίο θα δρα παράλληλα του πειράματος της θερμικής αντοχής. Σε αυτό το πείραμα, το οποίο εδώ αποκαλείται επιγενετικό, θα χρησιμοποιηθούν τρία διαφορετικά θερμικά καθεστάτα, όπου:  $T_1 = \text{ambient}$ ,  $T_2 = \text{ambient} + X^\circ\text{C}$  και  $T_4 = \text{ambient} + X^\circ\text{C} + 4^\circ\text{C}$  (βλ. σχήμα 7). Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας θα είναι ίδιος με αυτόν του πειράματος της θερμικής αντοχής, καθώς και τα δύο πειράματα θα πραγματοποιούνται ταυτόχρονα στις ίδιες λεκάνες νερού (water baths), καθώς επίσης επειδή και τα δύο αυτά πειράματα θα ξεκινήσουν ταυτόχρονα. Παρόλα αυτά, η επιγενετική μελέτη θα περιλαμβάνει μία επιπλέον φάση, η οποία θα ξεκινήσει με την αμοιβαία ανταλλαγή πειραματικών μονάδων μεταξύ των θερμικών καθεστώτων (βλ. σχήμα 7). Για να είναι εφικτή η ανταλλαγή αυτή, θα χρειαστούν αρχικά 3 ανεμώνες από κάθε γένος (γενεαλογία) ανά θερμικό επίπεδο και ανά είδος. Εν συνεχεία θα

Πρωτόκολλα πειραμάτων θερμικής αντοχής και επιγενετικών πειραμάτων σε θαλάσσιες ανεμώνες

ανταλλαχθούν μεταξύ των θερμικών καθεστώτων, αφού τελειώσει η φάση του εγκλιματισμού. Από τη στιγμή που κάθε γένος ανεμώνης αντιπροσωπεύει ένα αντίγραφο (replicate), θα υπάρχει ένα σύνολο 45 πειραματικών μονάδων ανά θερμικό καθεστώς (βλ. σχήμα 7). Για να δειχθεί η διαγενεαλογική πλαστικότητα, θα πρέπει να αφαιρεθεί η γονεϊκή γενιά να αποκοπεί από τον απόγονο και μόνο τότε θα πρέπει να παρθεί ο απόγονος από την πέμπτη γενιά ούτως ώστε να πραγματοποιηθεί η αμοιβαία ανταλλαγή. Εάν έχουμε όντως διαγενεαλογική πλαστικότητα, αναμένεται πως ο απόγονος θα έχει καλύτερες επιδόσεις σε εκείνο το θερμικό περιβάλλον, στο οποίο είχε εγκλιματιστεί η γονεϊκή γενιά.



(Σχήμα 7: Στήσιμο επιγενετικού πειράματος μετά την αμοιβαία ανταλλαγή. Το κόκκινο χρώμα υποδεικνύει ανεμώνες οι οποίες εγκλιματίστηκαν σε  $T_1$ , το πράσινο χρώμα υποδεικνύει ανεμώνες που εγκλιματίστηκαν σε  $T_2$  και το μπλε χρώμα υποδεικνύει ανεμώνες που εγκλιματίστηκαν σε  $T_4$ ).

## 3.2.: Παροχή θαλασσινού νερού

### 3.2.1.: Προέλευση του νερού

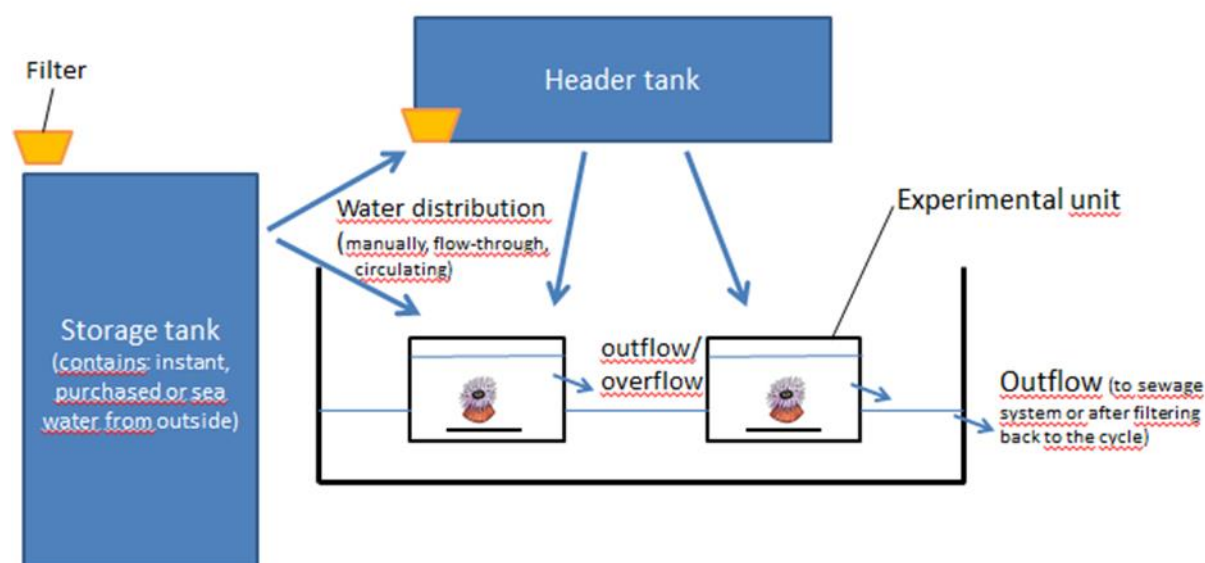
Υπάρχουν διάφορες επιλογές για την απόκτηση του θαλασσινού νερού. Στην καλύτερη των περιπτώσεων, θα υπάρχουν, στο εργαστήριο, σωληνώσεις οι οποίες θα μεταφέρουν νερό απευθείας από τη θάλασσα. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει απλά να ελεγχθεί πως το νερό δεν περιέχει σωματίδια και πλαγκτόν. Επίσης θα πρέπει να ελεγχθεί εάν χρειάζεται να φιλτραριστεί (το νερό) πριν εισέλθει στις αντλίες, τα τροφοδοτικά, τα λουτρά και τα δοχεία των ανεμώνων. Στην περίπτωση που χρειαστούν, τα φίλτρα θα πρέπει να έχουν το εξής μέγεθος:

- Για να απομακρύνουν άμμο και μεγάλα σωματίδια: >20mm
- Για να απομακρύνουν ζωοπλαγκτόν: 20 $\mu$ m – 20mm
- Για να απομακρύνουν φυτοπλαγκτόν: 0,2 – 20 $\mu$ m

Μία άλλη επιλογή για θαλασσινό νερό θα ήταν, να αγοραστεί από μία εταιρεία (π.χ. ζωολογικό κήπο). Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να υπολογιστεί, κατά προσέγγιση, η ποσότητα του νερού που θα είναι απαραίτητη για το πείραμα, πριν αυτό ξεκινήσει. Είναι εξαιρετικά σημαντικό, η δεξαμενή αποθήκευσης του νερού να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να μπορεί να χωρέσει τόσο μεγάλες ποσότητες νερού. Μία τρίτη επιλογή για απόκτηση θαλασσινού νερού, θα μπορούσε να είναι και η δημιουργία αυτού με ειδικό μείγμα. Αυτό είναι δυνατό να συμβεί όταν αναμειχθεί μη χλωριωμένο νερό με ένα σκεύασμα θαλασσινού νερού για ενυδρεία. Για να επιτευχθεί η απαιτούμενη αλατότητα των 33-35‰, θα πρέπει να αναμειχθούν 33gr αλατιού σε 1lt νερού. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει μερικές ημέρες, για αυτό θα ήταν καλό να ξεκινήσει η διαδικασία αυτή νωρίτερα του πειράματος. Ανεξαρτήτως των παραπάνω επιλογών, η αλατότητα και η θερμοκρασία του νερού θα πρέπει να είναι ίδια με τις τιμές από το σημείο συλλογής των ανεμώνων<sup>23</sup>.

---

<sup>23</sup> Θα πρέπει να σημειωθεί πως το φιλτράρισμα του νερού, εκτός των άλλων, γίνεται για να μην περάσουν στα δοχεία των ανεμώνων στοιχεία που θα μπορούσαν να αποτελέσουν τροφή για τις ανεμόνες. Η τροφοδότηση των ανεμώνων θα πρέπει να γίνεται ελεγμένα, όπως αναφέρεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.



(Σχήμα 8: επεξεργασία, διαμοιρασμός και αποθήκευση θαλασσινού νερού: με κίτρινο σημειώνονται οι πιθανές θέσεις των φίλτρων νερού)

### 3.2.2.: Διαχείριση θαλασσινού νερού

Στην περίπτωση που το θαλασσινό νερό περιέχει μεγάλη ποσότητα άλγης, ζωοπλαγκτόν ή άλλων σωματιδίων, θα πρέπει τότε να φιλτραριστεί. Ανάλογο με το μέγεθος των σωματιδίων θα είναι και το μέγεθος της «σίτας» του φίλτρου που θα χρησιμοποιηθεί. Στην περίπτωση που έχει εγκατασταθεί ένα σύστημα ανακύκλωσης νερού, η διαδικασία του φιλτραρίσματος θα πρέπει να γίνει, προτού το νερό εισέλθει στο σύστημα. Σε ένα τέτοιο σύστημα ανακύκλωσης, θα πρέπει επίσης να υπάρχουν και φίλτρα τα οποία να φιλτράρουν το ήδη υπάρχον νερό από σωματίδια που παράγονται κατά τη διάρκεια του πειράματος (π.χ. κόπρανα και λοιπά υπολείμματα).

### 3.2.3.: Διανομή του θαλασσινού νερού

Το θαλασσινό νερό του πειράματος θα μπορεί να διανέμεται ή/και να αλλάζει είτε από ένα «flow-through» σύστημα είτε από ένα σύστημα ανακύκλωσης είτε τέλος με την χειροκίνητη αλλαγή του. Ο πιο σωστός τρόπος είναι με τη χρήση του «flow-through» συστήματος. Στην περίπτωση αυτή, το νερό είτε θα εισέρχεται με τη

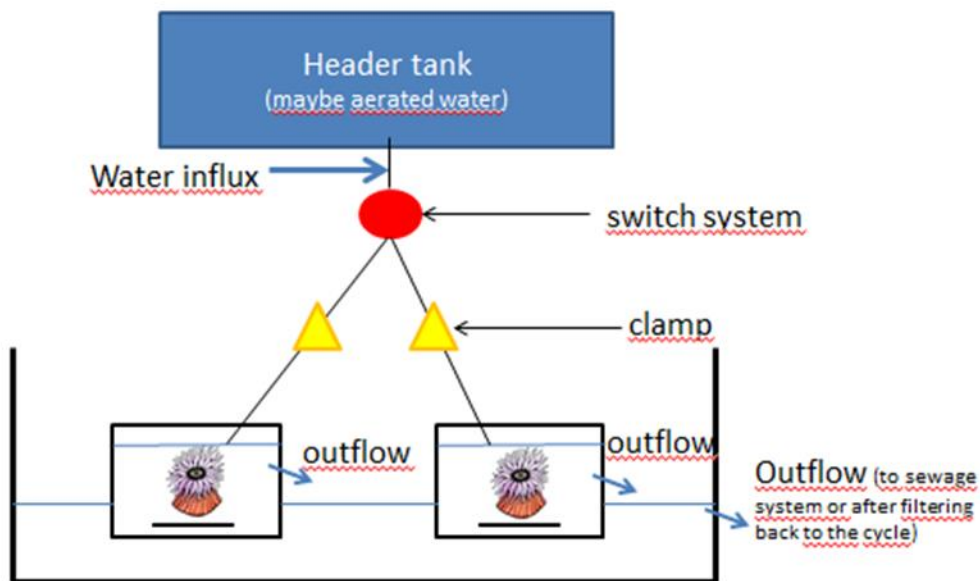
βοήθεια αντλίας στη δεξαμενή τροφοδοσίας νερού, από την οποία θα διανέμεται στη συνέχεια στα δοχεία με τις ανεμώνες, είτε θα μεταφέρεται από τη θάλασσα απευθείας στο δοχεία με τις ανεμώνες. Σε κάθε περίπτωση, το νερό θα περνάει μία φορά από τα δοχεία με τις ανεμώνες και μετά θα καταλήγει στο αποχετευτικό σύστημα. Από τη στιγμή που το σύστημα διανομής του νερού εγκατασταθεί (θα πρέπει να υπολογισθεί ο όγκος του νερού που περνά από το σύστημα ανά ώρα), ιδανικά δεν χρειάζεται περαιτέρω συντήρηση. Παρ'όλα ταύτα καλό θα ήταν να ελέγχονται οι σωληνώσεις και οι συνδέσεις που και που. Η παροχή του νερού μπορεί να ρυθμίζεται από ελεγκτές έγχυσης υγρών (βλ. σχήμα 9). Για αυτό το λόγο, μπορεί να τοποθετηθεί ένα σύστημα με διακόπτη στη δεξαμενή τροφοδοσίας νερού (βλ. σχήμα 9) από το οποίο να καταλήγουν σωλήνες στα δοχεία με τις ανεμώνες. Η ροή του νερού μέσα/από τους σωλήνες, θα μπορεί να ρυθμίζεται με ειδικούς ρυθμιστές (clamps).



[Σχήμα 9: παράδειγμα από ένα σύστημα έγχυσης (αριστερά) και ενός συστήματος με διακόπτες (δεξιά)]

Το σύστημα ανακύκλωσης του νερού είναι παρόμοιο με τα παραπάνω με τη μόνη διαφορά ότι το νερό επαναχρησιμοποιείται. Στην περίπτωση αυτή, είναι εξαιρετικά σημαντικό να εγκατασταθούν βιολογικές και χημικές μονάδες φιλτραρίσματος του νερού, οι οποίες να απομακρύνουν απόβλητα που προέρχονται από τον μεταβολισμό των ανεμώνων. Συνιστάται, επίσης, η χρήση δυνατών αντλιών που να μπορούν να διακινούν με ευκολία το νερό μέσα στο σύστημα.

Τέλος, εάν επιλεγεί η χειροκίνητη αλλαγή του νερού, θα πρέπει να γίνεται ανά δύο ημέρες. Η πρακτική αυτή όμως δεν συνιστάται.



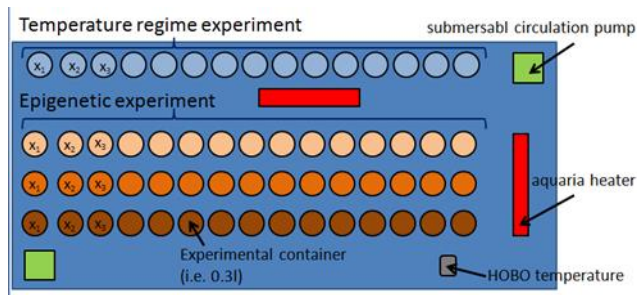
(Σχήμα 10: εφαρμογή του «flow-through» συστήματος με χρήση συστήματος ελέγχου έγχυσης. Με κόκκινο σημάδι φαίνεται το σύστημα με τους διακόπτες και με κίτρινο οι ρυθμιστές)

### 3.3.: Γενικό στήσιμο εργαστηρίου – Εργαλεία

#### 3.3.1.: Εργαλεία:

- αντλίες:
  - αντλίες αερισμού (η ποσότητα αντλιών εξαρτάται από τη δύναμη κάθε αντλίας).
  - υποβρύχιες αντλίες κυκλοφορίας νερού (2 ανά θερμικό λουτρό = 10 συνολικά). (*Heizer/Titanrohr, SCHEGO Schemel & Goetz GmbH & Co.Kg, 300 Watt, 300-600liter*)
- θερμαντήρες ενυδρείων (2 ανά θερμικό λουτρό = 10 συνολικά).
- καταγραφικά θερμοκρασίας της HOBO (1 ανά θερμικό λουτρό = 5 στο σύνολο, 2 τα οποία θα τοποθετηθούν στο σημείο συλλογής των ανεμώνων και 3 επιπλέον για να μπορούν να αντικαταστήσουν κάποιο εάν χαλάσει). [*HOBO Perdant Temperature Data Logger (UA-001-xx)*]
- θερμικά λουτρά (επί παραδείγματι: μεγάλες λεκάνες):

- συνολικά μπορούμε να έχουμε 5 θερμικά λουτρά στο πιλοτικό πείραμα με 5 διαφορετικές θερμοκρασίες.
  - στο βασικό πείραμα θα έχουμε 4 θερμικά λουτρά, όπου μόνο τα 3 θα χρησιμοποιηθούν και για τα δύο πειράματα (θερμικής αντοχής και επιγενετικό) και 1 θερμικό λουτρό θα χρησιμοποιηθεί μόνο για το πείραμα θερμικής αντοχής (βλ. κεφάλαιο περί σχεδιασμού πειράματος).
- δοχεία για το πείραμα τα οποία μπορεί να είναι απλά βάζα χωρητικότητας 0,3 λίτρων (έκαστο).
- στο πιλοτικό πείραμα: 50 ανά είδος (10 ανά θερμικό λουτρό).
- για το κυρίως πείραμα: 195 ανά είδος (πείραμα θερμικής αντοχής: 4 x 15 δοχεία και για το επιγενετικό πείραμα 3 x 45. Το 45 προκύπτει, καθώς χρειαζόμαστε τρεις δεκαπεντάδες).
- ρυθμιστές θερμοκρασίας: 5. (*HobbyBiotherm pro/ DOHSE AQUARISTIC KG*)
- 15 «γενεαλογικές» δεξαμενές (σε θερμοκρασία εργαστηρίου): σε αυτές τις δεξαμενές θα βρίσκονται αρχικά οι ανεμώνες. Τα ζώα θα πρέπει να συνηθίσουν τις συνθήκες του εργαστηρίου και να ξεκινήσουν ασεξουαλική αναπαραγωγή (βλ. σχήμα 11).
- φελιζόλ – μονωτικό υλικό για να μονωθούν τα θερμικά λουτρά.



[Σχήμα 11: στο σχήμα αυτό φαίνεται άποψη του θερμικού λουτρού από πάνω, το οποίο περιλαμβάνει 2 υποβρύχιες αντλίες κυκλοφορίας νερού 2 θερμαντήρες ενυδρείων, 1 καταγραφικό θερμοκρασίας, 15 δοχεία για το πείραμα θερμικής αντοχής και (3x15=)45 δοχεία για το επιγενετικό πείραμα. Το  $X_n$  υποδηλώνει μία συγκεκριμένη γενιά ανεμώνης η οποία προέρχεται από μία γενεαλογική δεξαμενή].

### 3.3.2.: Στήσιμο

Αρχικά πρώτο μέλημα θα πρέπει να είναι η ασφάλεια. Θα πρέπει να συνδεθούν στο εργαστήριο ειδικά πολύμπριζα που να είναι ασφαλή για λειτουργία σε υγρά περιβάλλοντα. Επιπρόσθετα, τα πολύμπριζα αυτά θα πρέπει να τοποθετηθούν στο ταβάνι (ή σε ψηλό μέρος) για να αποφευχθεί – μειωθεί η επαφή τους με το νερό. Καλό θα ήταν να αναλάβει αυτή τη δουλειά ειδικός τεχνικός.

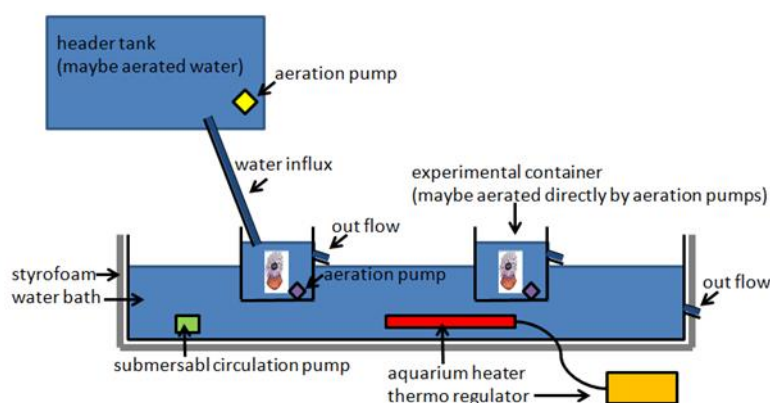
Αφού συλλεχθούν οι ανεμώνες, θα πρέπει να τοποθετηθούν 15 ζώα, τα οποία προέρχονται από 15 διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας (βλ. κεφάλαιο περί συλλογής ανεμώνων), μέσα σε αυτά που αποκαλούμε γενεαλογικές δεξαμενές, οι οποίες έχουν θερμοκρασία εργαστηρίου. Συνεπώς, στην αρχή θα υπάρχουν 15 γενεαλογικές δεξαμενές οι οποίες θα περιλαμβάνουν 1 ανεμώνη έκαστη. Στις γενεαλογικές δεξαμενές, οι ανεμώνες θα πρέπει να αναπαραχθούν όσο το δυνατόν γρηγορότερα, ούτως ώστε να παραχθούν αρκετά ζώα ώστε να εφοδιαστούν επαρκώς τα πειράματα. Θεωρούμε πως όλα τα ζώα σε μία γενεαλογική δεξαμενή αποτελούν αποικία.

Για να εξασφαλιστεί η παροχή οξυγόνου, οι αντλίες αερισμού θα πρέπει είτε να είναι συνδεδεμένες με τη δεξαμενή τροφοδοσίας νερού, από την οποία διανέμεται το θαλασσινό νερό στις πειραματικές μονάδες, είτε θα πρέπει να συνδεθούν απευθείας στα πειραματικά δοχεία και στις γενεαλογικές δεξαμενές. Για τον αερισμό των μονάδων ξεχωριστά, είναι απαραίτητη η παρουσία πετρών αερισμού σε κάθε πειραματικό δοχείο καθώς επίσης και στις γενεαλογικές δεξαμενές. Επίσης σε αυτή τη μέθοδο θα χρειαστούν και σωλήνες σιλικόνης οι οποίοι θα παρέχουν πεπιεσμένο αέρα στα δοχεία. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις θα πρέπει να γίνει προσεκτικός έλεγχος στο κατά πόσο η παροχή οξυγόνου είναι επαρκής. Η συγκέντρωση του οξυγόνου δεν θα πρέπει να είναι λιγότερη από 5 mg/l.

Για να επιτευχθεί η ύπαρξη διαφορετικών καθεστώτων θερμοκρασίας για το πείραμα της θερμικής αντοχής, θα χρειαστούν 4 μεγάλες λεκάνες νερού. Μόνο 3 από αυτές θα χρησιμοποιηθούν μετέπειτα για το επιγενετικό πείραμα (πείραμα διαγενεαλογικού εγκλιματισμού). Ο όγκος των θερμικών λουτρών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Για να μειωθεί η απώλεια της θερμοκρασίας, οι μεγάλες αυτές δεξαμενές θα πρέπει να καλυφθούν περιμετρικά με μονωτικό υλικό. Σε κάθε θερμικό λουτρό θα



πρέπει να τοποθετηθούν 2 θερμαντήρες, 2 υποβρύχιες αντλίες και ένα καταγραφικό θερμοκρασίας. Οι 2 θερμαντήρες θα πρέπει να συνδεθούν με ένα ρυθμιστή θερμοκρασίας. Ο ρυθμιστής θερμοκρασίας θα πρέπει να διατηρεί το νερό σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Σε 3 από τα θερμικά λουτρά θα υπάρχουν 60 μικρά δοχεία με ανεμώνες (και για τα δύο πειράματα). Στο τέταρτο λουτρό θα υπάρχουν μόνο 15 δοχεία, καθώς αυτά θα είναι μόνο για το πείραμα της θερμικής αντοχής. Και στα δύο πειράματα, σε κάθε μικρό δοχείο θα υπάρχει 1 ανεμώνη.



[Σχήμα 12: στο σχήμα αυτό φαίνεται άποψη του στησίματος του πειράματος από το πλάι. Το νερό από τη δεξαμενή τροφοδοσίας πηγαίνει στα μικρά δοχεία που περιέχουν τις ανεμώνες. Για την παροχή οξυγόνου υπάρχουν δύο επιλογές: μπορεί είτε να αεριστεί το νερό στη δεξαμενή τροφοδοσίας (κίτρινο τετράγωνο) είτε να αεριστεί κάθε ένα από τα μικρά δοχεία (μωβ τετράγωνο)].

### 3.4.: Συλλογή test animals

Τα καταλληλότερα είδη ανεμώνων για την προκειμένη έρευνα είναι εκείνα τα οποία θεωρούνται παρασιτικά είδη και αυτά που ευδοκιμούν σε διαταραγμένα περιβάλλοντα, όπως αυτά των λιμένων. Τα είδη αυτά είναι συχνά μικρού μεγέθους και παρουσιάζουν υψηλούς ρυθμούς ασεξουαλικής αναπαραγωγής. Εάν είναι εφικτό, θα πρέπει να συλλεχθούν τρία είδη ανεμώνων που να πληρούν τα παραπάνω κριτήρια, ούτως ώστε να διασφαλιστεί το γεγονός, ότι τουλάχιστον τα δύο είδη από αυτά, θα ανταποκριθούν με τέτοιο τρόπο, ο οποίος να επιτρέπει τη διεξαγωγή του πειράματος.

Πρωτόκολλα πειραμάτων θερμικής αντοχής και επιγενετικών πειραμάτων σε θαλάσσιες ανεμώνες

Για να εντοπιστούν τοποθεσίες στις οποίες μπορούν να βρεθούν ανεμώνες, κατάλληλες για το παρόν πείραμα, είναι απαραίτητο να ανατρέξει κανείς στην τοπική βιβλιογραφία και να έρθει σε επικοινωνία με ειδικούς στο αντικείμενο. Οι περιοχές συλλογής των ανεμώνων θα πρέπει να είναι ει δυνατόν πλησιέστερα στον τόπο διεξαγωγής του πειράματος, αλλά και να απέχει κάθε περιοχή συλλογής από την άλλη 10 – 15m, ούτως ώστε να αποφευχθεί η συλλογή κλώνων.

Το βάθος της στάθμης του νερού από όπου θα συλλεχθούν οι ανεμώνες θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν κοινό. Επίσης, καλό θα ήταν η συλλογή των ανεμώνων να γίνει από υποπαλιρροιακές περιοχές και όχι από παλιρροιακές.

Η δειγματοληψία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί το αργότερο μέχρι το τέλος της δεύτερης εβδομάδας, είτε από τους ερευνητές είτε από ειδικευμένη ομάδα καταδύσεων. Θα πρέπει πάντα να εξασφαλίζεται ένα ασφαλές περιβάλλον εργασίας. Εάν η συλλογή των ανεμώνων γίνεται σε παλιρροιακές περιοχές, τότε οι ανεμώνες θα πρέπει να συλλέγονται κατά τη διάρκεια της άμπωτης, ούτως ώστε να διασφαλίζεται το γεγονός, ότι οι ανεμώνες προέρχονται από υποπαλιρροιακούς πληθυσμούς. Επίσης, θα ήταν χρήσιμο να εξετασθεί η ώρα συλλογής των ανεμώνων. Υπάρχουν είδη τα οποία είναι νυκτόβια και την ημέρα παραμένουν συνεσταλμένα.

Εάν είναι εφικτό, καλό θα ήταν να έχει πραγματοποιηθεί μία επίσκεψη στον χώρο συλλογής των ανεμώνων πριν από την ημέρα συλλογής, ούτως ώστε να εξακριβωθεί εάν το επιθυμητό είδος ανεμώνης βρίσκεται εκεί και παρουσιάζει αφθονία για να πραγματοποιηθεί συλλογή μεγάλου αριθμού ζώων. Φυσικά δεν θα πρέπει σε καμία περίπτωση να γίνει εξάλειψη του τοπικού πληθυσμού εξαιτίας της υπερ-συλλογής. Τα εργαλεία τα οποία θα χρησιμοποιηθούν την ημέρα της συλλογής θα πρέπει να είναι καθόλα έτοιμα για χρήση, και αυτά τα οποία θα χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά για την τοποθέτηση των δειγμάτων, να σημειωθούν με την ημερομηνία και τον τόπο δειγματοληψίας.

Θα πρέπει επίσης να καταγραφούν η ώρα συλλογής, η θερμοκρασία του νερού κατά τη συλλογή, η αλατότητα του νερού κατά τη συλλογή, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο του νερού κατά τη συλλογή, το βάθος από το οποίο συνελέχθησαν οι ανεμώνες, η πυκνότητα του πληθυσμού των ανεμώνων, καθώς και οι γενικές συνθήκες που επικρατούσαν στην περιοχή (έκθεση σε κύματα, κλπ.). Επιπρόσθετα, θα πρέπει να καταγραφεί η ακριβής θέση συλλογής των ανεμώνων (π.χ. χρήση συστήματος GPS),

σε περίπτωση που καταστεί αναγκαία η εκ νέου επίσκεψη του χώρου (π.χ. για συλλογή περισσότερων ανεμώνων).

Από τη στιγμή που θα πραγματοποιηθούν με επιτυχία όλοι οι έλεγχοι, η περισυλλογή των ανεμώνων θα πρέπει να γίνει με τυχαίο τρόπο. Επί παραδείγματι, η επιλογή των ανεμώνων δεν θα πρέπει να εξαρτάται στη θέση του ζώου στο ευρύτερο σύνολο γύρω από το οποίο βρίσκεται. Όποια και να είναι η περίπτωση, οι ανεμώνες που θα συλλεχθούν θα πρέπει να έχουν όσο το δυνατόν κοινό μέγεθος και χρώμα. Για να αποφευχθεί η συλλογή κλώνων (καθώς στόχος δεν είναι η συλλογή ανεμώνων με ίδιο γενότυπο), η κάθε ανεμώνη η οποία θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για να παράξει τις γενεές οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα, θα πρέπει να συλλεχθεί σε απόσταση τουλάχιστον 10m από τις άλλες. Μαζί με τις ανεμώνες θα πρέπει να συλλεχθεί και το υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται προσκολλημένες. Στην περίπτωση που το υπόστρωμα είναι πολύ μεγάλο ή πολύ βαρύ, οι ανεμώνες θα πρέπει να απομακρυνθούν πολύ προσεκτικά από το υπόστρωμα με τη χρήση σπάτουλας και να τοποθετηθούν άμεσα σε μικρά γυάλινα δοχεία με θαλασσινό νερό.

Για τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, οι ανεμώνες θα πρέπει να τοποθετηθούν μεμονωμένα σε μεγαλύτερα δοχεία μέσα στα οποία οι τιμές της συγκέντρωσης του οξυγόνου και της αλατότητας να είναι σταθερές και φυσικά κατάλληλες για τις ανεμώνες. Ο χρόνος μεταφοράς από το χώρο συλλογής μέχρι το εργαστήριο θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος.

Για να γίνει εφικτή η παρακολούθηση και καταγραφή της θερμοκρασίας του νερού στα σημεία συλλογής των ανεμώνων, θα πρέπει να τοποθετηθούν ειδικά εξαρτήματα καταγραφής (temperature loggers). Ένα ανά σημείο είναι αρκετό. Η ημέρα και η ώρα τοποθέτησης των εξαρτημάτων καταγραφής θα πρέπει να σημειωθεί, ούτως ώστε να αναγνωρισθεί αργότερα εύκολα η στιγμή κατά την οποία ξεκίνησαν να καταγράφουν τη θερμοκρασία του νερού. Ο ελάχιστος ρυθμός καταγραφής θα πρέπει να ανέρχεται σε μία φορά την ημέρα. Τα εξαρτήματα καταγραφής θα πρέπει να τοποθετηθούν σε σημείο που να μην είναι εύκολα προσβάσιμο από τους ερευνητές, όμως να είναι δύσκολο να εντοπισθούν, ούτως ώστε να αποφευχθεί η απώλειά τους ή η καταστροφή τους από ψαράδες ή δύτες. Θα πρέπει να καταγραφεί επίσης η ώρα, η ημερομηνία και ο τόπος τοποθέτησης των μετρητών. Οι μετρητές θα πρέπει να είναι προσκολλημένοι σε ένα βαρύ αντικείμενο (π.χ. κομμάτι τσιμέντου) καθώς επίσης και να διαθέτουν ένα

είδος σημαδούρας (π.χ. ένα πλαστικό μπουκάλι γεμάτο αέρα) η οποία να μην να είναι εύκολη να εντοπισθεί αλλά να μην είναι προφανής. Θα μπορούσε επίσης να τοποθετηθεί ένα αυτοκόλλητο με τα στοιχεία του ερευνητικού ιδρύματος ή των ερευνητών, καθώς επίσης και ένα σημείωμα σε διάφορες γλώσσες, ούτως ώστε να αποθαρρύνονται πιθανοί ληστές. Τα στοιχεία που καταγράφουν τα εξαρτήματα καταγραφής θερμότητας θα πρέπει να συλλέγονται τακτικά (π.χ. μία φορά το μήνα), ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η ύπαρξη των στοιχείων, σε περίπτωση που τα εξαρτήματα για κάποιο λόγο χαλάσουν. Καλό θα ήταν οι μετρητές να παραμείνουν στο σημείο στο οποίο τοποθετήθηκαν για ένα χρόνο (διπλάσιο χρόνο από τη διεξαγωγή του πειράματος), ούτως ώστε να υπάρχουν δεδομένα για περισσότερο χρονικό διάστημα.

### 3.5.: Καλλιέργεια Αρτέμια

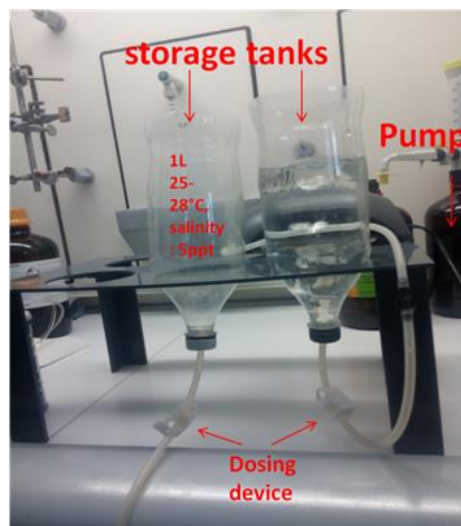
#### 3.5.1.: Γενικό στήσιμο

Για να πραγματοποιηθεί η καλλιέργεια της γαρίδας «*Artemia salina*» (βλ. εικόνα 1), η οποία θα αποτελέσει την τροφή των ανεμώνων, θα πρέπει να εγκατασταθούν κάποια δοχεία καλλιέργειας και αποθήκευσης. Ο αριθμός των δοχείων θα καθοριστεί με βάση τον ρυθμό ταΐσματος των ανεμώνων, όμως θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3. Τα δοχεία αυτά θα πρέπει να είναι χωρητικότητας 1lt έκαστο. Μία πιθανή λύση για τη δημιουργία των δοχείων, θα ήταν να κοπούν πλαστικά μπουκάλια (τα οποία θα τοποθετηθούν με το στόμιο προς τα κάτω). Σε αυτά θα πρέπει να τοποθετηθεί ένα είδος καλύμματος ούτως ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του νερού και η πιθανή διάχυσή του. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να διανοιχθούν τρύπες στην κάτω πλευρά του δοχείου (σε αυτή την περίπτωση, κάτω πλευρά είναι το στόμιο του μπουκαλιού) ούτως ώστε να μπορέσει να συνδεθεί μία αντλία, η οποία απαιτείται για να παρέχει πεπιεσμένο αέρα, ο οποίος χρειάζεται για την κυκλοφορία του νερού μέσα στα δοχεία. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται και ο σωστός αερισμός της καλλιέργειας. Επίσης, θα πρέπει να συνδεθεί και ένας σωλήνας (κατά προτίμηση σιλικόνης), ο οποίος θα συνδέει την αντλία με το δοχείο και ο οποίος θα χρησιμεύει και ως μέσο για τη συγκομιδή της Αρτέμιας (βλ. εικόνα 2). Ο σωλήνας αυτός θα πρέπει να

σφραγίζεται με μία συσκευή δοσομέτρησης (έλεγχος ένχυσης - clamp), τον οποίο μπορεί να τον προμηθευτεί κανείς από προμηθευτές ιατρικών εξαρτημάτων. Η συσκευή αυτή χρησιμεύει στον έλεγχο της εξόδου του νερού και ως εκ τούτου στον έλεγχο της ποσότητας της Αρτέμια η οποία συλλέγεται κάθε φορά.



Εικόνα 1: δοχείο με αυγά Αρτέμιας



Εικόνα 2: στήσιμο καλλιέργειας Αρτέμια

Αφού ολοκληρωθεί το στήσιμο, τα δοχεία θα πρέπει να γεμίσουν με νερό, του οποίου η αλατότητα να είναι 5psu. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της αραιώσης του θαλασσινού νερού με μη-χλωριούχο νερό βρύσης. Παρόλα ταύτα, η Αρτέμια μπορεί να επιβιώσει σε αλατότητες οι οποίες κυμαίνονται από 3psu έως 300psu. Όμως φτάνουν στο μάξιμουμ της εκόλαυσής τους όταν βρίσκονται σε υφάλμυρο νερό. Αφού ετοιμαστεί η αλατότητα του νερού, θα πρέπει να θερμανθεί και να αποκτήσει μία θερμοκρασία η οποία να κυμαίνεται στους 25oC - 28oC. Πριν τοποθετηθούν τα αυγά της Αρτέμιας στο δοχείο, θα πρέπει να αναμειχθούν 5gr αυγών σε 8ml νερού, μέσα σε διαφορετικό δοχείο και μετά το μείγμα αυτό να τοποθετηθεί επίσης στο έτοιμο δοχείο.

Τα αχρησιμοποίητα αυγά θα πρέπει να αποθηκευτούν σε μέρος δροσερό και ξηρό.

### 3.5.2.: Τεχνική Ταΐσματος

Οι ανεμώνες θα πρέπει να ταΐζονται καθημερινά. Η ποσότητα τροφής θα είναι κατά βούληση. Πριν από το πρώτο ταΐσμα όμως, θα πρέπει να μετρηθεί αρκετές φορές, κάτω από μικροσκόπιο, η ποσότητα της Αρτέμιας η οποία θα δοθεί σε μία ανεμώνη, ούτως ώστε να ποσοτικοποιηθεί η αφθονία αυτής.

### 3.5.3.: Ξεκινώντας την καλλιέργεια

Για να ξεκινήσει η καλλιέργεια της Αρτέμιας θα πρέπει να ακολουθηθούν τα ακόλουθα βήματα: πρώτα απ' όλα, θα πρέπει να σταματήσει ο αερισμός του δοχείου. Αυτό γίνεται με το κλείσιμο του σωλήνα με τη βοήθεια της συσκευής δοσομέτρησης. Εν συνεχεία, βάζουμε θαλασσινό νερό στο πρώτο δοχείο και μετά τοποθετούμε και τα αυγά στο νερό. Αφού μπουκ και τα αυγά, τότε ξεκινάμε πάλι τον αερισμό, ανοίγοντας τη συσκευή δοσομέτρησης για να επιτρέψει στον αέρα να κυκλοφορήσει στο σωλήνα. Τέλος, καλύπτουμε το δοχείο με ένα καπάκι ούτως ώστε να μειώσουμε την απώλεια του νερού μέσω της εξάτμισης και της πιθανής διάχυσης.

Την επόμενη ημέρα, θα πρέπει να ετοιμασθεί το δεύτερο δοχείο της καλλιέργειας, την τρίτη ημέρα το τρίτο κ.ο.κ. Την τέταρτη ημέρα, λογικά, θα είναι έτοιμο το πρώτο μπουκάλι.

### 3.5.4.: Συλλογή

Για να ξεκινήσει η διαδικασία της συλλογής, διακόπτουμε τον αερισμό του δοχείου. Αρχικά περιμένουμε για 10 λεπτά ούτως ώστε τα εκκολαφθέντα Αρτέμια να πάει στον πάτο του δοχείου και τα αυγά τα οποία δεν εκκολάφθηκαν να επιπλεύσουν στην επιφάνεια. Αφού συμβεί αυτό, αποσυνδέουμε τον σωλήνα από την αντλία αερισμού και τη χρησιμοποιούμε για να συλλέξουμε την Αρτέμια. Αυτό το κάνουμε ανοίγοντας το δοσομετρητή. Στο τέλος της διαδικασίας, καθαρίζουμε το δοχείο και το σωλήνα, επανασυνδέουμε το σύστημα και ξεκινάμε καινούργια καλλιέργεια.

## **Σχολιασμός**

Όταν ξεκινούσε η διαδικασία συγγραφής της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ο στόχος ήταν να πραγματοποιηθεί εξ ολοκλήρου το πείραμα, και να αναλυθούν τα αποτελέσματα αυτού. Αυτή τη στιγμή που γράφονται αυτές οι γραμμές, το πείραμα βρίσκεται σε εξέλιξη στους υπόλοιπους ερευνητικούς σταθμούς.

Από την πρώτη στιγμή, άρχισαν να διαφαίνονται κάποια προβλήματα, όσον αφορά την ορθή διεξαγωγή της έρευνας. Το σημαντικότερο ίσως πρόβλημα, αποτελεί η επιλογή του συγκεκριμένου ασπόνδυλου. Η θαλάσσια ανεμώνη ναι μεν συναντάται παγκοσμίως, όμως την βρίσκει κανείς σε ποικίλες μορφές. Η πρώτη δυσκολία ήταν το γεγονός, πως δεν ήταν εφικτό να βρεθούν κοινά είδη ανεμώνης σε όλους τους ερευνητικούς σταθμούς, ούτε όμως ήταν δυνατό να δημιουργηθούν «ζεύγη» σταθμών με κοινά είδη ανεμώνων. Η δεύτερη δυσκολία ήταν πως σε κάποιους σταθμούς εντοπίζονταν πολύ μεγάλα είδη ανεμώνης, τα οποία δεν ήταν εύκολα διαχειρίσιμα στις ποσότητες οι οποίες απαιτούνταν για τη διεξαγωγή του πειράματος αυτού. Επιπλέον, πολλά είδη παρουσίαζαν σεξουαλική αναπαραγωγή, κάτι το οποίο είναι απαγορευτικό για την συγκεκριμένη έρευνα. Ακόμα, βρέθηκαν είδη τα οποία δεν ζουν προσκολλημένα σε σκληρές επιφάνειες. Τα είδη αυτά ζουν θαμμένα, ουσιαστικά, στην άμμο. Αυτό εμφάνιζε μεγάλο πρόβλημα ως προς τον τρόπο με τον οποίο θα γίνονταν μετρήσεις βάρους, κατά τη διάρκεια των οποίων τα ζώα θα έπρεπε να παραμείνουν ζωντανά<sup>24</sup>. Ένα τελευταίο πρόβλημα, υπήρξε και το γεγονός του χρόνου που χρειαζόταν μία ανεμώνη για να αναπαραχθεί ασεξουαλικά. Η έρευνα είχε βασιστεί σε κάποιες καταγραφές οι οποίες ανέφεραν πως οι θαλάσσιες ανεμώνες, και ιδίως το γένος «*haliplanella*», παρουσίαζαν γρήγορους ρυθμούς ασεξουαλικής αναπαραγωγής. Αυτό δεν φάνηκε να συμβαίνει σε κανένα ερευνητικό σταθμό του παρόντος προγράμματος. Αντιθέτως, υπήρξαν πολλές καθυστερήσεις έως ότου προκύψουν οι απαιτούμενοι απόγονοι.

Εάν είναι εφικτό να υπερκεραστούν οι παραπάνω δυσκολίες, τότε το πείραμα θα μπορούσε να προσφέρει χρήσιμο υλικό για ένα είδος θαλάσσιου οργανισμού, για τον οποίο δεν υπάρχουν παγκοσμίως πολλές καταγραφές.

---

<sup>24</sup> Το σώμα των ανεμώνων αυτών, περιέχει ποσότητα της άμμου, μέσα στην οποία κατοικούν.

## **Βιβλιογραφία – Αρθρογραφία**

- Barry et al. 1995 Science, “Climate – related, long – term faunal changes in a California rocky intertidal community”
- Bonduriansky et Troy 2009 Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., “Nongenetic Inheritance and its evolutionary implications”
- Boudouresque et Velaque 2002 Marine pollution bulletin, “Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes”
- Briggs 2010 Marine Biology, “Marine biology: the role of accommodation in shaping marine biodiversity”
- Carlton 1987 Bulletin of Marine Science, “Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean”
- Carriker 1992 Journal of Shellfish Research, “Introductions and transfers of molluscs: risk considerations and implications”
- Craig 2010 Marine Biology, “Pattern versus process: broadening the view of marine invasive species”
- Eno et al. 1997 Joint Nature and Conservation Committee, Peterborough, “Non-native Marine Species in British Waters: A Review and Directory”
- Gilman et al. 2006 Proc. Natl. Acad. Sci., “Variation in the sensitivity of organismal body temperature to climate change over local and geographic scales”
- Godwin 2005 “Maritime Activities as a Mechanism for Introducing Marine Alien Species: Issues and Management”. In: Godwin, L. S. (Ed.), Hull fouling as a mechanism for marine invasive species introductions. In Proceedings of a workshop on current issues and potential management strategies.
- Gollasch et Leppakoski 1999 Nordic Council of Ministers, “Initial risk assessment of alien species in Nordic coastal waters”
- Gurevitch et Padilla 2004 Trends in Ecology & Evolution, “Are invasive species a major cause of extinctions?”
- Helmuth et al. 2002 Science, “Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress”
- Helmuth et al. 2006 Ecol. Monogr., “Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone: implications for climate change”



- Helmuth 2009 J. Exp. Biol., “From cells to coastlines: how can we use physiology to forecast the impacts of climate change?”
- Imke Podbielsky “Acclimation potential of the invasive sea anemone *Haliplanella lineata* (Verrill 1898) to changing salinities”, GEOMAR - Helmholtz Centre for Ocean Research, Kiel, 2014
- Jablonka et Raz 2009 The quarterly review of Biology, “Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution”
- Keane et Crawley 2002 Trends in Ecology & Evolution, “Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis”
- Kideys 2002 Science, “Fall and rise of the Black Sea ecosystem”
- Leppakoski et al. 2002 Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, “The Baltic - a sea of invaders”
- Lopez et al. 2013 Revista chilena de historia natural, “Potential dispersal mechanisms of the cryptogenic anemone, *Anemonia alicemartinae*”
- Lovei 1997 Nature, “Global change through invasion”
- McKinney et Lockwood 1999 Trends in Ecology & Evolution, “Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction”
- Olden et al. 2004 Trends in Ecology & Evolution, “Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization”
- Olenin et Daunys 2005 NATO Science Series - Earth and Environmental Series, “Invaders in suspension-feeder systems: Variations along the regional environmental gradient and similarities between large basins. In Dame R. & Olenin, S. (Eds.): The comparative roles of suspension feeders in ecosystems”
- Peck et al. 2009 Polar Biol., “Lack of acclimation in *Ophionotus victoriae*: brittle stars are not fish”
- Reise 1998 Senckenbergiana maritima, “Pacific oysters invade mussel beds in the European Wadden Sea”
- Reise et al. 1999 Helgoland Marine Research, “Introduced marine species of the North Sea coasts”
- Reise et al. 2005 Wadden Sea Ecosystem, “Introduced Species”

- Rositer 1996 Annu. Rev. Evol. Syst., “Incidence and consequences of inherited environmental effects”
- Ruesink et al. 2005 Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, “Introduction of non-native oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications”
- Ruiz et al. 1997 Oxford Journals, “Global Invasions of Marine and Estuarine Habitats by Non-Indigenous Species: Mechanisms, Extent, and Consequences”
- Ruiz et al. 1999 Limnology and Oceanography, “Non- indigenous species as stressors in estuarine and marine communities : Assessing invasion impacts and interactions”
- Sanford et Kelly 2011 Annu. Rev. Marine Sci., “Local Adaptation in Marine Invertebrates”
- Somero 2002 Integr. Comp. Biol., “Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and cost of living”
- Somero 2010 The journal of experimental biology, “The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’”
- Sorte et al. 2010 Global Ecology and Biogeography, “Marine range shifts and species introductions: comparative spread rates and community impacts”
- Torchin et al. 2003 Nature, “Introduced species and their missing parasites”
- Troy et Bonduriansky 2011 American society of naturalists, “A Unified Approach to the Evolutionary Consequences of Genetic and Nongenetic Inheritance”
- Wolff 1999 Helgoland Marine Research, “Exotic invaders of the meso-oligohaline zone of estuaries in the Netherlands: why are there so many?”
- Zamer et Mangum 1979 Bio. Bull., “Irreversible nongenetic temperature adaptation of oxygen uptake in clones of the sea anemone *Haliplanella Luciae* (Verrill)”

## **Προτεινόμενη Αρθρογραφία – Βιβλιογραφία**

- Alford et al. 2014 Web of science, “Could Behaviour and Not Physiological Thermal Tolerance Determine Winter Survival of Aphids in Cereal Fields?”
- Anacleto et al. 2014 Web of science, “Ecophysiology of native and alien-invasive clams in an ocean warming context”
- Barnes et al. 2011 Antarctic science, “The need to implement the Convention on Biological Diversity at the high latitude site, South Georgia”
- Barnes et al. 2010 Global Change Biology, “Ecological relevance of laboratory determined temperature limits: colonization potential, biogeography and resilience of Antarctic invertebrates to environmental change”
- Bates et al. 2013 Proceedings of the Royal Society, “Geographical range, heat tolerance and invasion success in aquatic species”
- Bocharovaa et Kozevicha 2010, “Modes of Reproduction in Sea Anemones (Cnidaria, Anthozoa)”
- Bonduriansky et al. 2011 Evolutionary Applications, “The implications of nongenetic inheritance for evolution in changing environments”
- Bozinovic et al. 2011 Annual review of ecology, evolution, and systematics, “Physiological Correlates of Geographic Range in Animals”
- Buclclin 1985 JEMBE, “Growth and asexual reproduction of the sea anemone *Metridium* : comparative laboratory studies of three species”
- Burdon et al. 2014 Estuarine coastal and shelf science, “Mass mortalities in bivalve populations: A review of the edible cockle *Cerastoderma edule*”
- Calosi et al. 2010 Journal of animal ecology, “What determines a species' geographical range? Thermal biology and latitudinal range size relationships in European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae)”
- Carter et Miles 1989 Biological Journal of the Linnean Society, “Gametogenic cycles and reproduction in the beadlet sea anemone *Actinia equina* (Cnidaria: Anthozoa)”
- Chapperon et Seuront 2011 Global change biology, “Behavioral thermoregulation in a tropical gastropod: links to climate change scenarios”
- Chown et Gaston 2008 Proceedings of the royal society b – biological sciences, “Macrophysiology for a changing world”

- Clayton et Lasker 1985 JEMBE, “Individual and population growth in the asexually reproducing anemone *AZPTASZA PALLZDA* Verrill”
- Coccia et al. 2013 Web of science, “Does Ecophysiology Determine Invasion Success? A Comparison between the Invasive Boatman *Trichocorixa verticalis verticalis* and the Native *Sigara lateralis* (Hemiptera, Corixidae) in South-West Spain”
- Compton et al. 2007 Journal of experimental marine biology and ecology, “Thermal tolerance ranges and climate variability: A comparison between bivalves from differing climates”
- Crean et al. 2014 Ecology, “Adaptive paternal effects? Experimental evidence that the paternal environment affects offspring performance”
- Cumbo et al. 2013 Mar Biol, “Brooded coral larvae differ in their response to high temperature and elevated pCO<sub>2</sub> depending on the day of release”
- Diederich et Pechenik 2013 Marine Ecology Progress Series, “Thermal tolerance of *Crepidula fornicata* (Gastropoda) life history stages from intertidal and subtidal subpopulations”
- di Lascio et al. 2011 Fundamental and applied limnology, “Different temperature tolerance of northern and southern European populations of a freshwater Isopod Crustacean species (*Asellus aquaticus* L.)”
- Donelson et al. 2012 Nature climate change, “Rapid transgenerational acclimation of a tropical reef fish to climate change”
- Duarte et al. 2012 Global change biology, “Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities”
- Dunphy et al. 2013 The journal of experimental biology, “Latitudinal comparison of thermotolerance and HSP70 production in F2 larvae of the greenshell mussel (*Perna canaliculus*)”
- Figueiredo et al. 2014 Nature climate change, “Increased local retention of reef coral larvae as a result of ocean warming”
- Finnegan et al. 2012 Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America, “Climate change and the selective signature of the Late Ordovician mass extinction”

- Gaston et al. 2009 American naturalist, “Macrophysiology: A Conceptual Reunification”
- Hale et al. 2011 Web of science, “Predicted levels of future ocean acidification and temperature rise could alter community structure and biodiversity in marine benthic communities”
- Hofmann et Todgham 2010 The annual review of physiology, “Living in the Now: Physiological Mechanisms to Tolerate a Rapidly Changing Environment”
- Hunter 1984 JEMBE, “The energetics of asexual reproduction Pedal laceration in the symbiotic sea anemone AZPTASZA PULCHELLA (Carlgen, 1943)”
- Johnson et Shick 1977 JEMBE, “Effects of fluctuating temperature and immersion on asexual reproduction in the intertidal sea anemone HALIPLANELLA LUGIAE (Verrill) in laboratory culture”
- Jost et al. 2012 Marine ecology progress series, “Enhancing thermal tolerance by eliminating the pejus range: a comparative study with three decapod crustaceans”
- Linares et al. 2013 Marine environmental research, “Does thermal history influence the tolerance of temperate gorgonians to future warming?”
- Liu et al. 2010 Aquaculture, “Effects of stocking density, algal density, and temperature on growth and survival of larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttalli*”
- Logan et al. 2012 Marine ecology progress series, “Latitudinal differences in *Mytilus californianus* thermal physiology”
- Magozzi et Calosi Global change biology, “Integrating metabolic performance, thermal tolerance, and plasticity enables for more accurate predictions on species vulnerability to acute and chronic effects of global warming”
- Malham et al. 2012 Journal of the marine biological association of the United Kingdom, “A review of the biology of European cockles (*Cerastoderma* spp.)”
- Marshall 2008 Ecology, “Transgenerational plasticity in the sea: contextdependent maternal effects across the life history”
- Marshall 2015 The company of biologists, “Environmentally induced (co)variance in sperm and offspring phenotypes as a source of epigenetic effects”
- McManus et al. 1997 Biol. Bull., “Physiological Variation Among Clonal Genotypes in the Sea Anemone *Haliplanella lineata*: Growth and Biochemical Content”

- Menendez – Guerrero et Graham 2013 *Ecography*, “Evaluating multiple causes of amphibian declines of Ecuador using geographical quantitative analyses”
- Mereta et al. 2014 *Journal of sea research*, “Geographical implications of seasonal reproduction in the bat star *Asterina stellifera*”
- Mermillod – Blondin et al. 2013 *Journal of experimental biology*, “Thermal tolerance breadths among groundwater crustaceans living in a thermally constant environment”
- Minasian et Mariscal 1979 *Biol. Bull.*, “Characteristics and regulation of fission activity in clonal cultures of the cosmopolitan sea anemone, *HALIPLANELLA LUCIAE* (VERRILL)”
- Minasian 1979 *JEMBE*, “The effect of exogenous factors on morphology and asexual reproduction in laboratory cultures of thee intertidal sea anemone, *HALZPLANELLA LUCZAE* (Verrill) (ANTHOZOA: ACTINIARIA) from Delaware”
- Minasian 1982 *JEMBE*, “The relationship of size and biomass to fission rate in a clone of the sea anemone, *HALIPLANELLA LUCIAE* (Verrill)”
- Morely et al. 2012 *Marine ecology progress series*, “Spatial and temporal variation in the heat tolerance limits of two abundant Southern Ocean invertebrates”
- Morely et al. 2012 *Web of science*, “Thermal Reaction Norms and the Scale of Temperature Variation: Latitudinal Vulnerability of Intertidal Nacellid Limpets to Climate Change”
- Morely et al. 2010 *Antarctic science*, “South Georgia: a key location for linking physiological capacity to distributional changes in response to climate change”
- Morely et al. 2009 *Marine biology*, “Thermal dependency of burrowing in three species within the bivalve genus *Laternula*: a latitudinal comparison”
- Morris et al. *Web of science*, “Integrating Phenotypic Plasticity Within an Ecological Genomics”
- Nguyen et al. 2011 *Web of science*, “Upper Temperature Limits of Tropical Marine Ectotherms: Global Warming Implications”
- Peck et al. 2010 *Marine biology*, “Poor acclimation capacities in Antarctic marine ectotherms”

- Polgar et al. 2014 Journal of thermal biology, “Gross mismatch between thermal tolerances and environmental temperatures in a tropical freshwater snail: Climate warming and evolutionary Implications”
- Pörtner 2012 Marine ecology progress series, “Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes”
- Previati et al. 2010 Journal of experimental marine biology and ecology, “Oxygen consumption in Mediterranean octocorals under different temperatures”
- Przeslawski et al. 2008 Global change biology, “Beyond corals and fish: the effects of climate change on noncoral benthic invertebrates of tropical reefs”
- Renborg et al. 2014 Evol. Ecol., “Variable salinity tolerance in ascidian larvae is primarily a plastic response to the parental environment”
- Ribeiro et al. 2012 Web of science, “Considerations for Assessing Maximum Critical Temperatures in Small Ectothermic Animals: Insights from Leaf-Cutting Ants”
- Richard et al. 2012 Journal of experimental marine biology and ecology, “Thermal acclimation capacity for four Arctic marine benthic species”
- Rivadeneira et al. 2010 Journal of biogeography, “Testing the abundant-centre hypothesis using intertidal porcelain crabs along the Chilean coast: linking abundance and life-history variation”
- Ronges et al. 2012 Journal of experimental biology, “Changes in extreme cold tolerance, membrane composition and cardiac transcriptome during the first day of thermal acclimation in the porcelain crab *Petrolisthes cinctipes*”
- Roy et al. 2009 Proceedings of the royal society b – biological sciences, “A macroevolutionary perspective on species range limits”
- Salinas et Munch 2012 Ecology letters, “Thermal legacies: transgenerational effects of temperature on growth in a vertebrate”
- Salinas et al. 2013 VERSITA, “Non-genetic inheritance and changing environments”
- Saunders et Muller Parker 1997 Journal of experimental marine biology and ecology, “The effects of temperature and light on two algal populations in the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835)”

- Saupe et al. 2014 Journal of biogeography, “Climate change and marine molluscs of the western North Atlantic: future prospects and perils”
- Scheffers et al. Global change biology, “Microhabitats reduce animal's exposure to climate extremes”
- Scheffers et al. Web of science, “Thermal Buffering of Microhabitats is a Critical Factor Mediating Warming Vulnerability of Frogs in the Philippine Biodiversity Hotspot”
- Schiel et al. 2004 Ecology, “Ten years of induced ocean warming causes comprehensive changes in marine benthic communities”
- Scott et Johnston 2012 PNAS, “Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish”
- Sebens 1981 Biol. Bull., “The allometry of feeding, energetics, and body size in three sea anemone species”
- Sebens 1981 Journal of experimental marine biology and ecology, “Reproductive ecology of the intertidal sea anemones ANTHOPLEURA XANTHOGRAMMICA (Brandt) and A. ELEGANTZSSZMA (Brandt): body size, habitat, and sexual reproduction”
- Shick Malkom, “*A functional biology of sea anemones*”, Springer-Science & Business Media, B. V., Orono USA, 1991
- Sokolova et Lanning 2008 Climate research, “Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change”
- Sorte et al. 2011 Journal of experimental marine biology and ecology, “Geographic variation in temperature tolerance as an indicator of potential population responses to climate change”
- Stella et al. 2011 Oceanography and marine biology: an annual review, “Coral – associated invertebrates: diversity, ecological importance and vulnerability to disturbance”
- Stillman et Tagmount 2009 Molecular ecology, “Seasonal and latitudinal acclimatization of cardiac transcriptome responses to thermal stress in porcelain crabs, *Petrolisthes cinctipes*”
- Storch et al. 2011 Marine ecology progress series, “Thermal tolerance of larval stages of the Chilean kelp crab *Taliepus dentatus*”



- Sunday et al. 2011 Proceedings of the royal b – biological sciences, “Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms”
- Tattersall et al. 2012 Comprehensive physiology, “Coping with Thermal Challenges: Physiological Adaptations to Environmental Temperatures”
- Tewksbury et al. 2008 Ecology, “Putting the Heat on Tropical Animals”
- Tomasovych et al. Global ecology and biogeography, “Nonlinear thermal gradients shape broad-scale patterns in geographic range size and can reverse Rapoport's rule”
- Valentine et al. 2013 Paleobiology, “The sampling and estimation of marine paleodiversity patterns: implications of a Pliocene model”
- Valentine et Jablonski 2010 Paleontology, “Origins of marine patterns of biodiversity: some correlates and applications”
- van Heerwaarden et al. 2012 Journal of evolutionary biology, “Complex patterns of local adaptation in heat tolerance in *Drosophila simulans* from eastern Australia”
- Walsh et Somero 1981 Marine Biology, “Temperature Adaptation in Sea Anemones: Physiological and Biochemical Variability in Geographically Separate Populations of *Metridium senile*”
- Wernberg et al. 2012 Global change biology, “A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems”
- Wright et al. 2009 Conservation biology, “The Future of Tropical Species on a Warmer Planet”