

Pro gradu –tutkielma

Isäntäkalan altistushistorian vaikutus *Diplostomum pseudospathaceum* -loisen tartuntamenestykseen ja genotyyppien välisiin vuorovaikutussuhteisiin

Liisa Alaoutinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

17.1.2016

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

ALAOUTINEN LIISA, A.: Isäntäkalan altistushistorian vaikutus *Diplostomum pseudospathaceum* -loisen tartuntamenestykseen ja genotyyppien välisiin vuorovaikutussuhteisiin

Pro gradu: 33 s.

Työn ohjaajat: Dos. Anssi Karvonen, FT Katja-Riikka Louhi

Tarkastajat: Prof. Jouni Taskinen, Dos. Anssi Karvonen

Tammikuu 2016

Hakusanat: ristikkäisresistenssi, spesifinen immuniteetti, tartuntahistoria, vaiheittainen immunisaatio

TIIVISTELMÄ

Luonnossa isännät altistuvat usein monille loislajeille sekä niiden genotyypeille. Altistuminen tapahtuu usein eri aikaan johtuen loisinnan ajallisesta ja paikallisesta vaihtelusta, minkä seurauksena loisia vastaan kehittyvät immuunivasteet syntyvät vaiheittaisesti. Loiset voivat vaikuttaa toisiinsa suoraan kilpailemalla elintilasta tai resursseista, tai epäsuorasti isännän immuunijärjestelmän kautta. Kahden loisgenotyypin yhtäaikaisen tartunnan on aiemmissa tutkimuksissa havaittu kuormittavan isännän immuunijärjestelmää niin, että kummankin genotyypin tartuntamenestys on tällöin korkeampi. Tutkielmassani selvitin, miten isännän altistushistoria vaikuttaa loisten välisiin vuorovaikutussuhteisiin. Kalaisäntinä käytettiin 0+ -vuotiaita kirjolohia, jotka altistettiin ensin *Diplostomum pseudospathaceum* - ja *D. baeri* -loisille sekä molemmille lajeille yhtä aikaa. Kontrollina kokeessa oli ryhmä, jota ei altistettu. *Diplostomum pseudospathaceum* tunnetaan kalojen loiskaihin aiheuttajana ja se on yleinen suomalaisilla kalanviljelylaitoksilla, kun taas *D. baeri* ei vaikuta kalan näkökykyyn. Hankitun I. spesifisen immuniteetin annettiin kehittyä viiden viikon ajan, jonka jälkeen kalat altistettiin uudelleen *D. pseudospathaceum* -loisen eri genotyypeille ja näistä satunnaisesti muodostetuille pareille. Havaittiin, että immunisaatiotausta ei vaikuttanut *D. pseudospathaceum* -loisen tartuntamenestykseen kun kalat altistettiin yhdelle genotyypille. Loisten genotyyppien välillä esiintyi kuitenkin merkittävää geneettistä vaihtelua niiden kyyvyssä infektoita erilaisia isäntien immuunivasteita, mikä tukee ajatusta siitä, että isännän tartuntahistoria voi ylläpitää loisten geneettistä monimuotoisuutta. *Diplostomum baeri* -loisella immunisoidut kalat eivät eronneet muista immunisointiryhmistä, mikä osoittaa, että kirjolohi kykenee kehittämään ristikkäisresistenssiä näille kahdelle loislajille. Tutkielmani päätulos oli se, että immuunipuolustuksen kuormituksen positiivinen vaikutus loisen tartuntamenestykseen katosi isännän immunisoinnin myötä. Toisin sanoen, kahden genotyypin yhtäaikainen hyökkäys ei enää johtanut korkeampaan tartuntamenestykseen aiemmin loisen kohdanneissa kaloissa. Tämä on merkittävää, ja sillä voi olla keskeinen rooli mm. loisten infektiotaktiikoiden ja virulenssin evoluution kannalta.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science
Aquatic Science

ALAOUITINEN LIISA, A.: Effect of host exposure history on infection success and genotype interactions of *Diplostomum pseudospathaceum* parasite

Master of Science Thesis: 33 p.

Supervisors: Doc. Anssi Karvonen, PhD Katja-Riikka Louhi

Inspectors: Prof. Jouni Taskinen, Doc. Anssi Karvonen

January 2016

Key Words: cross-resistance, infection history, sequential immunization, specific immunity

ABSTRACT

Hosts are typically exposed to multiple parasite species and genotypes in nature. Exposure typically takes place at different times due to spatial and temporal variation in parasitism which leads to sequential development of host immune responses against parasites. Parasites can interact directly through competition for space or resources, or indirectly through host's immune system. Earlier studies have shown that a simultaneous attack by two parasite genotypes burdens host's immune defense so that the infection success of both parasite genotypes increases. I studied how the exposure history of the host affects interactions between parasites. Young-of-the-year rainbow trout were used as fish hosts and were first immunized with either *Diplostomum pseudospathaceum* or *D. baeri* parasite, or with a mix of both species. Immunologically naïve fish were used as controls. *Diplostomum pseudospathaceum* is very common on Finnish fish farms and known to cause cataracts, whereas *D. baeri* doesn't affect the vision of fish. Fish were kept for five weeks to allow development of acquired specific immunity after which they were exposed again to a range of single and randomly paired *D. pseudospathaceum* genotypes. I found that immunization background did not affect the infection success of *D. pseudospathaceum* in single exposures. However, significant genetic variation was observed between parasite genotypes in their ability to infect different host immunization backgrounds, which supports the theory of host's infection history maintaining genetic variation among parasite populations. Fish immunized with *D. baeri* didn't differ from the other immunization groups, which indicates that rainbow trout is capable of producing cross-resistance against both parasites. The main result was that the positive effect of burdening of the immune system on the infection success of the parasite genotypes was lost along with the immunization of the host. In other words, the simultaneous attack by two parasite genotypes did not lead to an increase in infection success in the previously infected hosts. This is important and suggests that host infection history may play a large role in the evolution of parasite infection strategies and virulence.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
2. TUTKIMUKSEN TAUSTA	7
2.1. Miten kalat puolustautuvat yksi- ja monisoluisia loisia vastaan?	7
2.2. Immuunijärjestelmän toimintaan ja infektion onnistumiseen vaikuttavat tekijät .8	
2.3. Loisinnan ajallinen ja paikallinen vaihtelu.....	9
2.4. Loisten interaktiot ja niiden merkitys.....	10
2.5. Tutkimuksessa käytettävien <i>Diplostomum</i> -loisten elinkierto.....	11
3. AINEISTO JA MENETELMÄT	13
3.1. Aineiston hankinta.....	13
3.2. Kotiloiden käsittely	13
3.3. Ensimmäinen altistus (immunisointi).....	14
3.4. Uudelleenaltistus	14
3.5. Tilastolliset menetelmät	15
4. TULOKSET	16
4.1. Loisten prevalenssi luonnossa ja infektiivisyys kokeen aikana	16
4.2. Kalan koon ja kerkariatuotannon vaikutus loismäärään.....	16
4.3. Altistushistorian vaikutus <i>D. pseudopathaceum</i> -loisen tartuntamenestykseen 18	
4.4. Immunisointitaustan vaikutus genotyyppien välisiin vuorovaikutussuhteisiin... 19	
5. TULOSTEN TARKASTELU	22
5.1. Genotyyppien väliset erot tartuntamenestyksessä.....	22
5.2. Kahden genotyypin yhtäaikaiset infektiot ja niiden merkitys	23
5.3. Loislajien väliset vuorovaikutukset.....	25
5.4. Mitä merkitystä loisten välisillä vuorovaikutuksilla on isännän kannalta?.....	25
5.5. Työn rajoitteet	26
5.6. Päätelmät	26
Kiitokset	27
Kirjallisuus	27

1. JOHDANTO

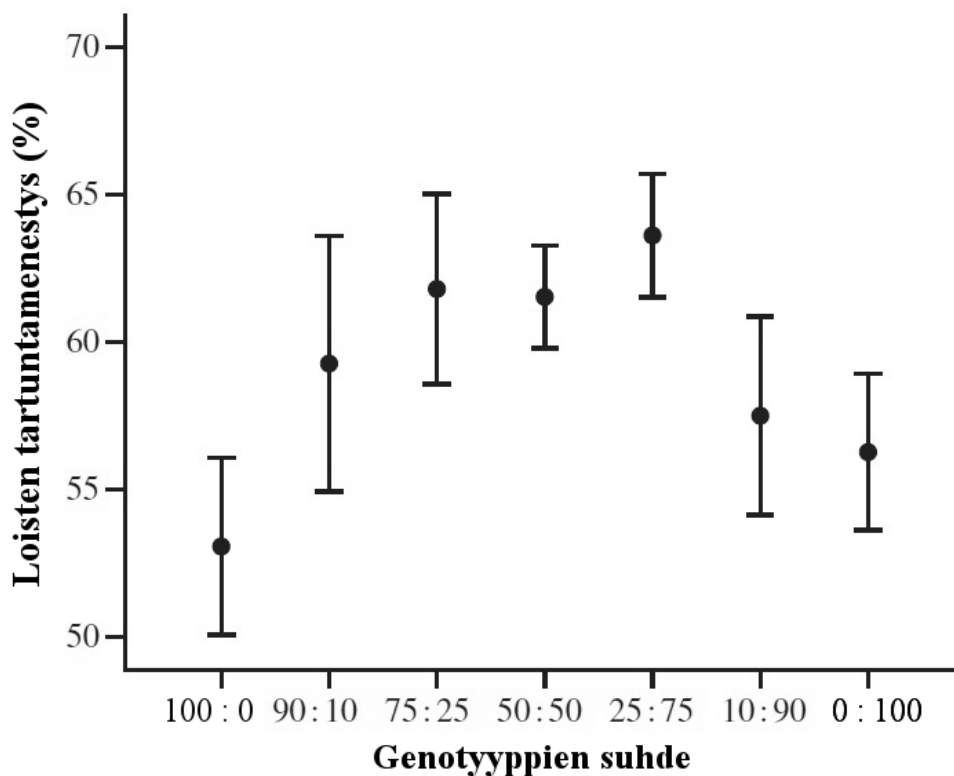
Arvioiden mukaan noin puolet kaikista eliöistä loisii jossain vaiheessa elämänsä (Price 1980). Vapaana elävät eliöt altistuvatkin luonnossa yleensä monille loisille ja yhdessä isännässä on tyypillisesti monia erilaisia loislajeja ja useita saman lajin yksilöitä. Loisyhteisön koostumus ja loisinnan intensiteetti vaihtelee luonnossa ajallisesti ja paikallisesti bioottisten ja abiottisten tekijöiden mukaan. Tähän vaihteluun vaikuttavat mm. elinympäristön olosuhteiden muutokset, isännän kunto ja loisten monimuotoiset elinkierto-omaisuudet, ja loisinnassa tyypillisesti esiintyvä ajallinen (esim. vuodenaikojen mukaan) ja paikallinen (esim. väli-isäntien laikuittainen esiintyminen) vaihtelu (esim. Jokinen ym. 1995, 2011, Dillon 2000, Harris & Bird 2000, Marcogliese 2001). Tästä syystä isännät altistuvat loisille useimmiten eri aikaan eli vaihteeltaisesti, jolloin jokaiselle isännälle syntyy uniikki tartuntahistoria. Isännän immuunipuolustus kehittyy jokaisessa kohtaamisessa uuden loisen kanssa, joten loiset joutuvat kohtaamaan luonnossa hyvin monenlaisia immuunitaustoja. Isännällä on synnynnäisesti joitakin immuunipuolustuksen mekanismeja loistartuntoja vastaan, mutta kokemattomat isännät ovat usein alttiimpia loisten tartunnoille kuin jo loisia kohdanneet isännät (Karvonen ym. 2005). Hankittu I. spesifinen immunitetti kehittyy vaihteittain jokaisessa kohtaamisessa uuden loisen kanssa ja voi jatkossa vaikuttaa loisten tartuntamenestykseen, vuorovaikutuksiin ja syntyvään yhteisörakenteeseen (Karvonen ym. 2009).

Siirtyminen isännästä toiseen I. transmissio on loisen elinkierrossa kriittinen ja keskeisesti loisen kelpoisuuteen vaikuttava vaihe. Tästä syystä luonnonvalinnan tulisi teoriassa karsia vaihtelua loisen tartuntapiirteissä poistamalla kelpoisuudeltaan heikompia alleeleja populaatiosta (Roff 1997). Isäntäelin ympäristön epäennustettavuudesta johtuen eri loislajien ja -genotyyppien yhteisinfektioit kuitenkin voivat ylläpitää geneettistä monimuotoisuutta loispopulaatiossa (Seppälä ym. 2012). Yhteisinfektioit voivat myös johtaa loisten välisiin suoriin tai epäsuoriin vuorovaikutuksiin. Isännän samoissa elimissä esiintyvät loiset voivat esimerkiksi kilpailla isännän sisällä resursseista tai elintilasta (Poulin & Valtonen 2002) ja vaikuttaa siten isännän elinkelpoisuuteen ja loisten transmissioon (Pedersen & Fenton 2007). Loiset voivat myös vaikuttaa toisiinsa epäsuorasti isännän immunitetin kautta kasvattamalla isännän vastustuskykyä ja siten hankaloittamalla mahdollisesti myös muiden loisten tarttumista (Fellowes ym. 1999, Pedersen & Fenton 2007, Graham 2008, Ezenwa ym. 2010). Tällä voi olla merkitystä loisten isännälle aiheuttaman haitan I. virulenssin tai tartuntamenestyksen kannalta (van Baalen & Sabelis 1995, Frank 1996, Gandon ym. 2001, Råberg ym. 2006).

Luonnossa isäntä altistuu usein monille saman loislajin genotyypeille (Louhi ym. 2013). Genotyyppien yhtäaikainen infektiio voi syntyä, jos isäntä liikkuu alueella, jossa on useita samalla lajilla infektoituneita väli-isäntiä, tai se voi altistua usealla genotyypillä infektoituneen väli-isännän tuottamille infektiivisille toukkavaiheille. Genotyyppien välisessä kilpailutilanteessa isännän loistaakka saattaa jäädä pienemmäksi kuin yhden genotyypin infektiiossa, koska resurssikilpailu rajoittaa molempien loisten menestymistä (Rauch ym. 2008). Toisaalta kahden genotyypin yhtäaikainen hyökkäys voi kuormittaa isännän immuunijärjestelmää, jolloin niiden yhteinen tartuntamenestys on suurempi kuin yksittäisen genotyypin infektiiossa (Karvonen ym. 2012b). Isännän tartunta- ja immunisaatiohistorian vaikutusta loisgenotyyppien välisiin vuorovaikutuksiin ei kuitenkaan tunneta, vaikka isäntäeliöt tyypillisesti altistuvat ja immunisoituvat eri loislajeille käytännössä koko elämänsä ajan. Isännän tartuntahistorian sävyttämät loisten väliset vuorovaikutukset voivat johtaa evolutiivisiin muutoksiin loisten elinkiertostrategioissa.

Tutkielmani tarkoituksena on pyrkiä vastaamaan kysymykseen, vaikuttaako isännän altistushistoria ja siitä seuraava hankitun immuniteetin kehittyminen loislajien ja -genotyyppien välisiin vuorovaikutussuhteisiin. Tutkimuskohteina käytin Suomessa yleisesti esiintyviä imumatoloisia, *Diplostomum pseudospathaceum* ja *D. baeri* (Trematoda, Digenea), joiden elinkierrossa kotilot ja kalat toimivat väli-isäntinä ja kaloja syövä lintu pääisäntänä. *Diplostomum pseudospathaceum* -kerkaria-toukat vaeltavat kalan linssiin, kun taas *D. baeri* -toukat esiintyvät silmän lasiaisessa (Valtonen & Gibson 1997). Linssissä esiintyvät loiset aiheuttavat kalalle näön heikentymistä ja kaihia, joka on yleinen ongelma suomalaisilla kalanviljelylaitoksilla (Kuukka ym. 2006). Tässä tutkimuksessa loin kokeellisesti erilaisia altistustaustoja kaloille altistamalla niitä *Diplostomum* -loisille. Tällä pyrittiin kuvastamaan luonnossa tavattavia tilanteita, joissa isännät ovat altistuneet yhdelle tai usealle loislajille. Loisgenotyyppien välisistä interaktioista (mm. Karvonen ym. 2012b, Seppälä ym. 2012) ja kalan spesifisistä immuunivasteista (Whyte ym. 1987, Jokinen 2012) tiedetään tässä tutkimussysteemissä jo melko paljon, mutta immunisaation vaikutusta interaktioihin ja tartuntamenestykseen ei ole vielä tutkittu.

Tutkimukseni hypoteesina on, että loisgenotyyppien välillä esiintyy eroja tartuntamenestyksessä, sillä elinympäristön epäennustettavuus ja vaihtelu vaikuttavat genotyyppien menestymiseen (Seppälä ym. 2012). Immunisoimattomilla kaloilla havaitaan todennäköisesti kahden genotyypin yhtäaikaisen infektion tuoma tartuntaetu (Kuva 1), kun taas immunisoiduilla kaloilla tämä ilmiö on heikompi tai puuttuu kokonaan, koska loiset joutuvat kamppailemaan isännän hankitun puolustusjärjestelmän kanssa. Lisäksi mikäli kaloissa syntyvät vasteet näitä kahta lähisukuista lajia vastaan reagoivat ristiin, on mahdollista, että altistuminen *D. baeri* -loiselle voi antaa isännälle suojaa myös toisen loislajin kohtaamiseen.



Kuva 1. *Diplostomum pseudospathaceum* -loisten tartuntamenestys (\pm keskivirhe) oli huonompi yksittäisten genotyyppien (100:0 ja 0:100) kuin kahdesta eri loisgenotyypistä muodostettujen

parien altistuksessa (genotyyppi A:n suhde genotyyppi B:hen). Muokattu julkaisusta Karvonen ym. (2012b).

2. TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1. Miten kalat puolustautuvat yksi- ja monisoluisia loisia vastaan?

Kala voi puolustautua loisia vastaan useilla eri tavoilla, jotka voidaan jakaa ulkoisiin ja sisäisiin puolustusmekanismeihin. Ensinnäkin, kala voi välttää loisia käyttäytymisellään ja estää siten kontaktin tapahtumisen. Esimerkiksi Karvonen ym. (2004b) havaitsivat, että kala kykenee aistimaan loisten läsnäolon vedessä ja alentamaan tartuntariskiä uimalla pois tartunnan lähteestä. Kohtaamisen tapahtuessa kala puolustautuu loisia vastaan tiiviillä ruumiinrakenteella ja limaisella iholla, jotka estävät loisen tarttumista (Jokinen 2012). Mikäli loinen kuitenkin pääsee kalan elimistöön, se kohtaa ensin synnynnäisen immuunijärjestelmän, joka koostuu monista erilaisista puolustusmekanismeista. Näitä mekanismeja ovat mm. mikrobien kasvua estävät proteiinit, soluseiniä hajottavat lysosyymientsyymit, solusyöntiin l. fagosytoosiin kykenevät neutrofiilit, monosyytit ja makrofagit, solusyöntiä tehostava komplementti sekä luonnolliset NCC-tappajasolut (Jokinen 2012). Synnynnäisen immunitietin lisäksi useat loiset saavat aikaan isännässä ensimmäisellä altistuskerralla erikoistuneiden muistisolujen kehittymisen, jolloin loisen toisessa kohtaamisessa isännän hankittu immunitietti voi toimia loista vastaan tarkennetummin ja nopeammin (Jokinen 2012). Kalan synnynnäinen immunitietti toimii nopeasti ja laaja-alaisesti hyvin monia taudinaiheuttajia vastaan, kun taas hankittu immunitietti aktivoituu hitaammin, mutta toimii hyvin kohdistetusti kutakin loista vastaan. Hankittu immunitietti perustuu tunkeilijan pintaproteiinien, antigeenien, tunnistamiseen, mikä on ainakin osittain periytyvä ominaisuus (van Muiswinkel ym. 1999). Kalan spesifinen immunitietti voi koostua joko soluvälitteisistä reaktioista tai humoraalisista eli vasta-ainevasteista (Jokinen 2012).

Kalojen immuunivasteita bakteeritartuntoja vastaan ei täysin tunneta, mutta on todistettu, että sekä synnynnäisen että hankitun immunitietin humoraaliset ja soluvälitteiset vasteet ovat tärkeässä roolissa bakteeritartunnan torjumisessa (Ellis 1999). Epäspesifiseen humoraaliseen vasteeseen kuuluvat bakteerien kasvua estävät proteiinit ja monimuotoiset lyysiinit, joiden tehtävänä on hajottaa vieraita soluja. Spesifinen humoraalinen vaste koostuu useista erilaisista vasta-aineista. Epäspesifinen soluvälitteinen puolustus perustuu bakteeritartunnoissa lähinnä neutrofiilien ja makrofagien harjoittamaan fagosytoosiin. Spesifisessä soluvälitteisessä puolustuksessa T-lymfosyyttien tuottamien interferonien tehtävänä on tehostaa makrofagien toimintaa. Esimerkiksi yersinioosia (ERM) lohikaloille aiheuttava *Yersinia ruckeri* saa kaloissa aikaan neutrofiilien ja makrofagien aktivoitumisen ja solusyönnin tehostumisen tulehdusalueella (Afonso ym. 1998). Kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*) kehittää yersinioosia vastaan spesifiseen immuunipuolustukseen kuuluvia vasta-aineita (Cossarini-Dunier 1985), johon liittyy myös tietyn säätelygeenin toiminnan aktivoitumista (Rodriguez ym. 2005).

Yksisoluisia alkueläinloisia vastaan kalat puolustautuvat yleensä NCC-tappajasoluilla, syöjäsoluilla ja spesifisellä vasta-ainetuotannolla (Dickerson & Clark 1996). Esimerkiksi valkopilkkutautia aiheuttava *Ichthyophthirius multifiliis* sai aikaan pilkkupiikkimonnilla (*Ictalurus punctatus*) epäspesifisten tappajasolujen lisääntymisen (Graves ym. 1985) sekä spesifisen vasta-ainetuotannon käynnistymisen (Clark ym. 1988). Myös kirjolohi kehitti valkopilkkutautia vastaan spesifisiä soluvälitteisiä ja humoraalisia puolustusmekanismeja (Olsen ym. 2011). B- ja T-solut sekä makrofagit olivat tärkeässä

osassa kalan kidusepiteelillä tapahtuvaa puolustusta yhdessä sytokiinien aktivoimien immunoglobuliinien kanssa.

Kalojen synnynäinen puolustus monisoluisia loisia vastaan koostuu mm. solukalvoja hajottavista lysosyymienientsyymeistä, valkuaisaineiden ketjureaktion aktivoivasta komplementista, verenkiertoa tartunta-alueella tehostavalla tulehdusreaktiosta ja solusyönnistä (Alvarez-Pellitero 2008). Monet loiset saavat aikaan myös spesifisen immuunivasteen. Esimerkiksi kalan linssiin tunkeutuva *D. pseudospathaceum* -imumato saa aikaan kalassa spesifisen immuunireaktion, jonka voimakkuudesta on erilaisia tuloksia. Whyte ym. (1987) havaitsivat kalassa spesifisen vasta-ainetuotannon käynnistymisen loisen kerkaria-toukille altistettaessa kun taas Höglund & Thuvander (1990) eivät havainneet spesifejä vasta-ainereaktioita kirjolohella. Toistuva altistuminen loisille nosti kuitenkin kalojen immunoglobuliinitasoja sekä synnynäisessä immunitetissa tärkeiden neutrofiilien ja monosyyttien osuutta verenkierrossa. Kirjolohi kehitti siis loista vastaan sekä spesifejä että epäspesifejä immuunivasteita.

2.2. Immuunijärjestelmän toimintaan ja infektion onnistumiseen vaikuttavat tekijät

Ympäristötekijät, kuten lämpötila ja veden kemialliset ominaisuudet, vaikuttavat kalan immuunijärjestelmän toimintakykyyn (Jokinen ym. 1995, 2011, Harris & Bird 2000). Kalat ovat vaihtolämpöisiä eläimiä, joten veden lämpötilalla on suuri vaikutus elimistön sisällä tapahtuviin prosesseihin ja siten myös immuunijärjestelmän toimintanopeuteen (Rijkers ym. 1980). Alhaisissa lämpötiloissa immuunijärjestelmä toimii viiveellä, mutta lämpimässä vedessä reaktiot tapahtuvat nopeammin (Rijkers ym. 1980, Alcorn ym. 2002). Veden alhainen happipitoisuus taas heikentää immuunivasteiden voimakkuutta ja tuotantoa (Bowden 2008). Myös valon määrä säätelee joillain lajeilla immuunivasteiden voimakkuutta (Bowden 2008); valoisaan aikaan kalat tuottavat immunologisia yhdisteitä enemmän kuin pimeällä (Esteban ym. 2006). Immuunivasteiden voimakkuus vaihtelee siten suuresti eri vuodenaikoina; kesällä immuunijärjestelmän toiminta on aktiivisempaa kuin talvella (Slater & Schreck 1998, Bowden 2008). Ympäristötekijöistä ja vuodenaikasta johtuva vaihtelu ravinnon saatavuudessa heijastuu myös immuunijärjestelmän toimintaan, koska se kuluttaa paljon energiaa (Schmid-Hempel 2011). Joidenkin loisten aiheuttama haitta isännälle voi olla vakavampi talvella, kun ravintopula heikentää entisestään yksilön kuntoa (Lemly & Esch 1984).

Kalan kasvun ja stressin aikana vapautuvat hormonit vaikuttavat monimutkaisesti immuunijärjestelmän toimintaan (Harris & Bird 2000). Stressaavissa tilanteissa kalan verenkiertoon erittyy kortisolia, jolla on immuunijärjestelmän toiminnan kannalta haitallinen vaikutus (Harris & Bird 2000). Myös sukusolujen tuotantoon vaikuttavien sukupuolihormonien on havaittu vaikuttavan myös negatiivisesti immuunivasteisiin (Slater & Schreck 1993). Kalan kasvuun ja osmoregulaatioon vaikuttava kasvuhormoni taas usein tehostaa immuunivasteiden toimintaa (ks. Harris & Bird 2000). Kalan kasvun ja sukusolujen tuotannon vuodenaikainen rytmi heijastuu siten myös immuunijärjestelmän toimintaan.

Schmid-Hempel & Ebert (2003) esittivät, että isännän immuunivasteissa esiintyvää vaihtelua selittävät sekä isäntäyksilön elämänsykliin ja energian allokointiin liittyvät seikat että isännän ja loisen väliset genotyypispesifiset vuorovaikutukset. Immunitetin kehittäminen ja ylläpitäminen vaativat yksilöltä resursseja (Schmid-Hempel 2011). Resurssien rajallisuus taas asettaa yksilön vaihtokauppatilanteeseen (engl. *trade-off*), jossa isäntä joutuu punnitsemaan missä määrin se allokoii käytettävissä olevan energian kasvuun, lisääntymiseen, petojen välttämiseen sekä immuunijärjestelmän kehittämiseen ja ylläpitoon (Sheldon & Verhulst 1996, Webster & Woolhouse 1999, Lochmiller & Deerenberg 2000,

Sandland & Minchella 2003). Nämä elinkierron piirteet eivät tosin välttämättä ole toisiaan poissulkevia, vaan esimerkiksi immuunijärjestelmään panostaminen edistää myös yksilön henkiin jäämistä (Lochmiller & Deerenberg 2000). Usein kelpoisuuden (engl. *fitness*) mittarina käytetty lisääntyminen on kuitenkin tyypillisesti raskasta yksilön immuunijärjestelmälle, jolloin se altistuu samalla myös taudeille ja loisille (Sheldon & Verhulst 1996). Kasvuun ja aikaiseen sukukypsyyteen panostaminen eivät myöskään välttämättä vaikuta yksilön kelpoisuuteen heti, mutta se voi olla pitkällä aikavälillä joko hyvä tai huono sijoitus riippuen elinympäristön olosuhteista (Sandland & Minchella 2003). Näihin vaihtokauppatilanteisiin voivat vaikuttaa lisäksi mm. ravinnon saatavuus ja erot ravinnonhankintakyvyssä, jotka luovat vaihtelua isäntien kehitysvaiheisiin ja siten edelleen immuunivasteisiin (Jokela ym. 2000, Sandland & Minchella 2003). Nämä ilmiöt voivat johtaa myös loispopulaatioiden evoluutioon, koska niiden on sopeuduttava kohtaamaan hyvin erilaisia isäntiä ja laaja-alaisia immuunivasteita.

Infektion onnistuminen ei siis välttämättä riipu pelkästään isännän kyvystä vastustaa infektiota, vaan myös loisen ja isännän geneettisestä yhteensopivuudesta (Schmid-Hempel 2008). Geneettinen yhteensopivuus voi tarkoittaa loisgenotyypin yhteensopivuutta sekä synnynnäisen että hankitun immuniteetin mekanismien kanssa (Secombes & Chappell 1996, Carius ym. 2001, Kurtz 2005). Geneettistä yhteensopivuutta on tutkittu kokeellisesti altistamalla ristiin sekä samalla alueella eläviä (l. *sympatrisia*) että eri alueilla eläviä (l. *allopatrisia*) isäntä- ja loispopulaatioiden yksilöitä (Lively & Dybdahl 2000, Théron & Coustau 2005, Voutilainen ym. 2009). Loisten parempi kyky infektoida *sympatrisia* kuin *allopatrisia* isäntäpopulaatioita (Lively 1989) voi viitata siihen, että infektion tapahtumiseksi isännällä ja loisella täytyy olla tarpeeksi samanlaiset alleelit (engl. *matching alleles*).

2.3. Loisinnan ajallinen ja paikallinen vaihtelu

Loisinnan intensiteetti ja loisyhteisön lajikoostumus vaihtelevat usein sekä ajallisesti että paikallisesti. Isäntien altistuminen loisille voi vaihdella niin vuorokaudenajan (Karvonen ym. 2004b) kuin vuodenajankin ja siitä johtuvien lämpötilan vaihteluiden mukaan (Marcogliese 2001). Monet loislajit vapauttavat toukkamuotojaan eniten siihen vuorokaudenaikaan, kun niiden seuraavan isännän aktiivisuus on suurimmillaan (Lewis ym. 1989, Taskinen ym. 1991). Tällöin tartuntakyvyltään lyhytikäisen loistoukan ja isännän kohtaaminen on todennäköisempää, kuin jos toukkia vapautuisi satunnaisesti (Karvonen ym. 2004b). Pohjoisilla leveysasteilla loisten transmissio keskittyy kesään, koska jääkansi talvikaudella katkaisee transmission pääisäntiin ja pääisännistä takaisin vesistöön. Esimerkiksi joillakin heisimadoilla (Cestoda) ja imumadoilla (Trematoda), joilla pääisäntä on maalla talvehtiva lintu tai nisäkäs, transmissio pääisännästä väli-isäntiin ajoittuu avovesikauden aikaan (Karvonen ym. 2012a, Pulkkinen & Valtonen 2012). Transmission rytmittyminen vuodenaikojen mukaan voi johtua myös väli-isäntien elinkierrosta. Esimerkiksi jotkin loisit kantavat eläinplanktonlajit talvehtivat lepomuotoina, jolloin niissä olevat loisit eivät voi tartuttaa seuraavia isäntiä (Marcogliese 2001). Myös monien loislajien väli-isäntinä toimivilla keuhkokotiloilla (Pulmonata) on monimutkaisia elinkiertoja, joissa kotilot voivat lisääntyä joko kerran tai useita kertoja elämänsä aikana (Dillon 2000). Vain kerran elämänsä aikana l. semelparisesti lisääntyvät kotilot kuolevat heti lisääntymisensä jälkeen, jolloin niiden kantama loisyhteisökin tuhoutuu. Tämä tarkoittaa, että näiden lajien kautta tapahtuva loisten transmissio voi tapahtua vain ajoittaisesti.

Lämpimän veden aikaan monien loistoukkien tuotanto ja isäntien loismäärät saavuttavat huippunsa (esim. Valtonen & Valtonen 1980, Koskivaara ym. 1991, Taskinen

ym. 1991, 1994, Waadu & Chappell 1991, Karvonen ym. 2004b, 2006, Poulin 2006, Studer & Poulin 2014). Lämpötila vaikuttaa siis tartuntariskiinkin, mutta toisaalta lämmin vesi myös lyhentää monien loisten toukkien elinikää (Studer & Poulin 2014). Poikkeuksellisen lämpimien jaksojen aikana kerkariatuotanto voi hetkellisesti tehostua, mutta riskinä on kotiloisännän yllirasittuminen ja mahdollinen kuolema (Paull ym. 2015). Toisaalta esim. *Henneguya creplini* -itiöeläimen elinkierrossa suurin prevalenssi kalapopulaatiossa on talvella (Haaparanta ym. 1994). Nämä erot loisinnan prevalenssissa ja intensiteetissä voivat johtua vaihtelusta immuunitoiminnan aktiivisuutta määrittävien valkosolujen osuudessa kalan veressä lämpötilan ja vuodenajan mukaan (Whyte ym. 1987, Jokinen ym. 1995, 2011). Lohikaloilla, jotka suosivat viileitä vesiä, lämpötilan nousu vaikuttaa yleensä negatiivisesti immuunivasteiden toimintaan (Jokinen ym. 2011). Esimerkiksi taimenella (*Salmo trutta*) havaittiin immuunipuolustuksen kannalta tärkeiden valkosolujen määrän olevan korkeimmillaan keväisin ja syksyisin (Álvarez ym. 1998). Lämmintä vettä suosivalla suutarilla (*Tinca tinca*) taas valkosolujen määrä putoaa talven aikana ja nousee jälleen vesien lämmitessä (Collazos ym. 1998).

Ravintoketjussa I. trofisesti siirtyvien loisten runsaus isännissä on usein suhteessa syötyjen väli-isäntien määrään. Loisten määrä isännässä voi vaihdella kausittaisesti ravintokohteiden tarjonnan tai isännän ekologiseen tarpeeseen, kuten ravinnonhankintaan, suojautumiseen tai lisääntymiseen, sopivan oleskelualueen mukaan (Amundsen ym. 2003, Valtonen 1980). Toisaalta lämpötila voi myös vaikuttaa loisten menestymiseen isännässä, jolloin syötyjen väli-isäntien määrä ei välttämättä suoraan korreloi isännästä löytyvien loisten määrän kanssa. Tähän vaikuttavat mm. isännän immuniteetti, kunto tai muut ympäristöstä johtuvat tekijät (Valtonen & Valtonen 1980).

Loiset ovat riippuvaisia isännistään, joten isäntien esiintyminen vaikuttaa loisten elinkierron onnistumiseen. Isännillä taas on ekologisia vaatimuksia elinympäristönsä suhteen, jolloin sopivien elinympäristöjen I. habitaattien sijainti määrittää myös loisten esiintymistä. Laikuittaisuus väli-isäntien esiintymisessä, isäntien liikkuminen loisten esiintymisalueella sekä loistartuntojen vuodenaikaisuus vaikuttavat siihen, missä järjestyksessä isäntä millekin loiselle altistuu (Karvonen ym. 2009). Kullekin isäntäyksilölle syntyy näin yksilöllinen loistartuntojen ja immuunivasteiden historia. Eri aikaan tapahtuvien loistartuntojen aikaansaamat immuunivasteet (Whyte ym. 1987, Jokinen 2012) taas voivat vaikuttaa seuraavien loisten menestymiseen. Toisin sanoen, isännät infektoituvat ja immunisoituvat luonnossa vaihteellisesti, jolloin loisten kohtaamisjärjestys voi vaikuttaa syntyvään loisten yhteisörakenteeseen ja sen sisäisten vuorovaikutusten luonteeseen (Jackson ym. 2006, Karvonen ym. 2009).

2.4. Loisten interaktiot ja niiden merkitys

Luonnossa isännät altistuvat usein samanaikaisesti monille loisille, jotka voivat vaikuttaa toistensa menestymiseen. Jotkin loislajit käyttävät elinkierrossaan samoja isäntälajeja (Poulin ym. 2000, Poulin 2001, Leung & Poulin 2007) tai niiden transmissio ajoittuu samaan vuodenaikaan (Karvonen ym. 2006), jolloin ne siirtyvät todennäköisemmin samoihin isäntiin yhtäaikaaisesti. Ne voivat kilpailla suoraan elintilasta tai resursseista tai vaikuttaa toisiinsa epäsuorasti isännän immuunijärjestelmän kautta. Loislajien väliset vuorovaikutukset voivat olla positiivisia (Leung & Poulin 2007), negatiivisia tai neutraaleja (Poulin 2001, Telfer ym. 2010). Elintilasta kilpailevien loisten välinen vuorovaikutus on usein negatiivinen, sillä isännän tarjoama elintila on rajallinen (Poulin & Valtonen 2002). Immuunijärjestelmän kautta tapahtuva vuorovaikutus voi olla positiivista tai negatiivista riippuen siitä, missä järjestyksessä loiset isännän kohtaavat ja millä tavalla ne saavat aikaan isännän immuunivasteet (Jackson ym. 2006). Loinen voi

myös aikaansaada isännässä ristikkäisresistenssin kehittymisen, jonka takia myös toisen, usein läheistä sukua olevan, loisen infektiomenestys kärsii (ristikkäisresistenssi; Jackson & Tinsley 2003, Karvonen ym. 2009).

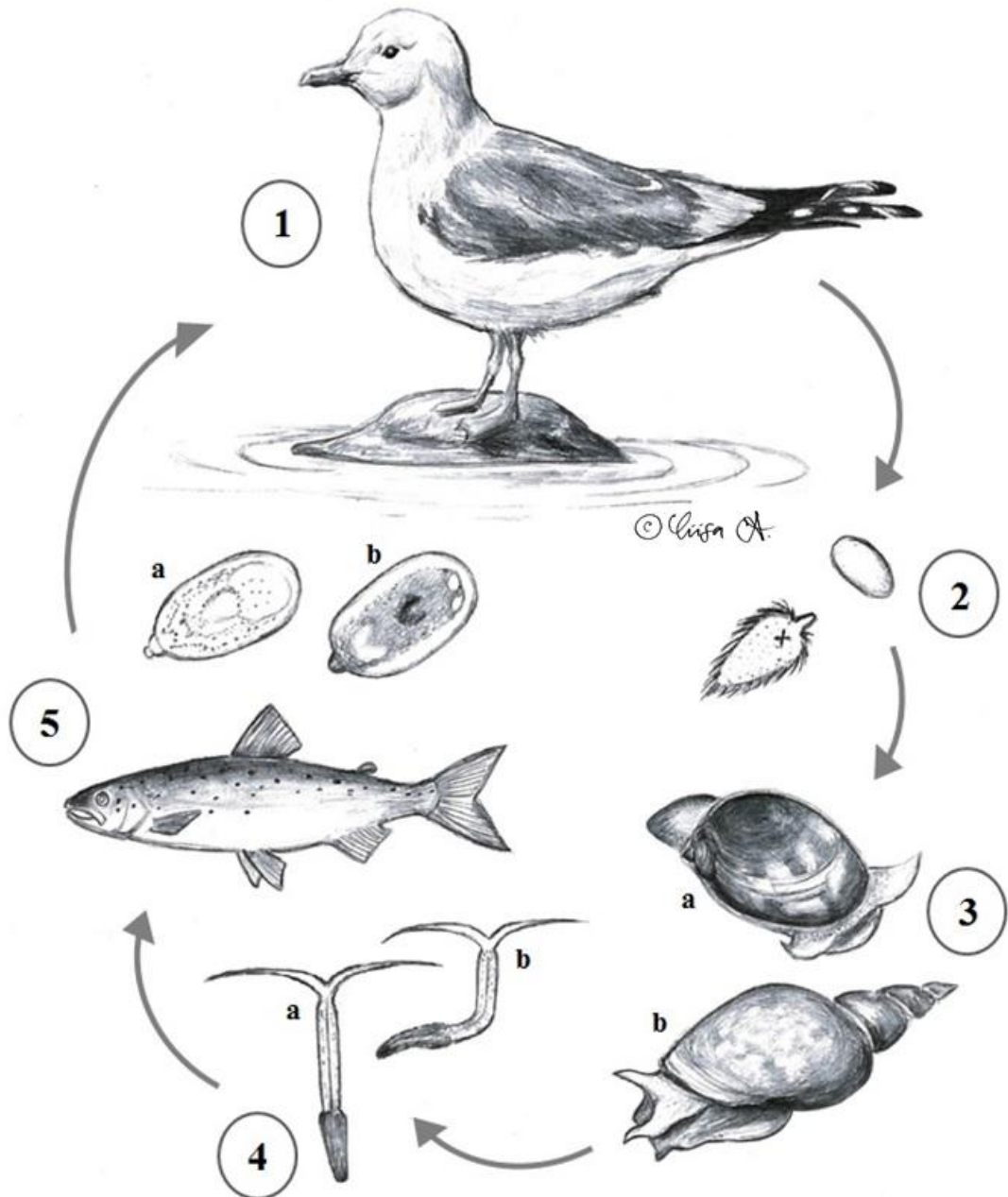
Yhden loislajin eri genotyypit voivat myös vaikuttaa toistensa menestymiseen isännässä. Genotyypit voivat kilpailla keskenään isännän resursseista, jolloin niiden tartuntamenestys on heikompi kuin yksittäisen genotyypin tartunnassa (Rauch ym. 2008). Genotyyppien yhtäaikainen hyökkäys voi toisaalta olla isännän immuunijärjestelmälle raskaampi kuin yhden genotyypin aiheuttama tartunta, jolloin ne menestyvät yksittäisiä genotyyppisiä paremmin (Taylor ym. 1998, Karvonen ym. 2012b). Isännän aiempien loistartuntojen tai niiden aikaan saaman immunisaation vaikutusta loisgenotyyppien välisiin vuorovaikutuksiin ei kuitenkaan tunneta.

Loisten välisellä kilpailulla voi olla merkitystä mm. loisen virulenssin evoluution kannalta (van Baalen & Sabelis 1995, Frank 1996, Gandon ym. 2001, Råberg ym. 2006). Esimerkiksi, virulentimpi bakteerigenotyyppi voi menestyä paremmin kuin vähemmän virulentti genotyyppi, koska se on tehokkaampi jakautumaan ja saavuttaa nopeammin suuremman tiheyden isännässä (Råberg ym. 2006). Toisaalta isäntä on voinut jo hankkia immunitettia kyseistä bakteeria vastaan, jolloin immuunipuolustus kohdistuu hyökkäävämpää l. virulentimpia genotyyppiä kohtaan. Tämän seurauksena vähemmän virulentti genotyyppi pääsee taas lisääntymään vapaammin isännässä ja voi menestyä kilpailijaansa paremmin (Råberg ym. 2006).

2.5. Tutkimuksessa käytettävien *Diplostomum* -loisten elinkierto

Tutkin kalan hankitun immunitetin vaikutusta loisgenotyyppien väliseen vuorovaikutukseen hyvin tunnetuilla *Diplostomum* -imumatoloisilla. *Diplostomum pseudospathaceum* ja *D. baeri* (Trematoda, Digenea) esiintyvät Suomessa yleisesti monilla eri kalalajeilla (Valtonen & Gibson 1997). Molemmilla lajeilla limakotilot ja kalat toimivat elinkierron väli-isäntinä ja kaloja syövä lintu pääisäntänä (Kuva 2). Linnun suolistossa suvullisen lisääntymisen seurauksena syntyneet munat poistuvat ulosteiden mukana veteen, missä kuoriuduttuaan *D.pseudospathaceum* -loisen mirakidia-toukat infektoivat mm. isolimakotilon (*Lymnaea stagnalis*) ja *D. baeri* -loisen toukat vaippalimakotilon (*Myxas glutinosa*) (Karvonen ym. 2006). Kotilon sukuelimissä loiset muodostavat sporokystikudoksia, joissa tapahtuu tehokas suvuton lisääntyminen. Kudoksissa loiset kehittyvät kerkaria-toukiksi, jotka vapautuvat veteen. Kerkaria-toukat uivat aktiivisesti ylöspäin vesipatsaassa ja odottavat, kunnes kalaisäntä tulee tarpeeksi lähelle, jolloin ne lävistävät kalan ihon tai kidusepiteelin ja kulkeutuvat silmään, *D. pseudospathaceum* linssiin ja *D. baeri* lasiaiseen (Williams 1966, Valtonen ym. 1997, Kennedy 2001). Koska *D. baeri* jää kalan lasiaiseen, se ei aiheuta kalalle näköhaittoja toisin kuin *D. pseudospathaceum*, jonka tartunta voi johtaa loiskaihin muodostumiseen (Marcogliese 2001) ja kalan näkökyvyn heikkenemiseen (Karvonen ym. 2004c).

Luonnossa näiden loisten metakerkaria-toukkia löytyy useista kalalajeista, mm. särjistä (*Rutilus rutilus*) ja ahvenista (*Perca fluviatilis*) (Valtonen ym. 1997), mutta myös kirjolohen on myös todettu olevan altis molemmille loisille (Karvonen ym. 2006). *Diplostomum pseudospathaceum* on yleinen myös kalanviljelylaitosten maa-altaissa (Kuukka ym. 2006), joissa tavataan yleisesti loisen tarvitsemia pääisäntiä ja kotiloväliisäntiä. Loisen aiheuttama kaihi voi hidastaa kalan kasvua (Karvonen & Seppälä 2008) ja altistaa sen petojen saalistukselle (Seppälä ym. 2004).



Kuva 2. *Diplostomum* -loisten elinkierrossa 1) pääisäntä on kaloja syövä lintu, jonka suolistossa loiset lisääntyvät suvullisesti. Ulosteiden mukana poistuu veteen 2) munia, joista kuoriutuu vapaana uivia mirakidia-toukkia. Toukat etsiytyvät 3) ensimmäisiin väli-isäntiin, kotiloihin (a *Myxas glutinosa*, b *Lymnaea stagnalis*), joissa loiset lisääntyvät suvuttomasti. Kotiloista vapautuu 4) kerkaria-toukkia (a *D. baeri*, b *D. pseudospathaceum*), jotka odottavat seuraavaa väli-isäntää pyrähdellen vedessä kaksihaaraisen häntänsä avulla. Loiset tunkeutuvat 5) kalan ihon tai kidusepiteelin läpi ja vaeltavat silmään, jossa niistä kehittyy metakerkaria-toukkia (a *D. baeri* lasiaiseen, b *D. pseudospathaceum* linssiin). Piirros Liisa Alaoutinen.

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1. Aineiston hankinta

Tutkimuskaloina käytettiin muutaman kuukauden ikäisiä kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasia. Kalat oli alun perin kasvatettu kalanviljelylaitoksessa, joka käytti vesilähteenään pohjavettä. Koska pohjavedessä ei ole kalojen loisia, voidaan olla varmoja, että kalat eivät olleet altistuneet *Diplostomum*-loisille eivätkä siten kehittäneet immunitteettia loisia vastaan ennen kokeita. Kalat olivat kokeen ajan läpivirtausaltaissa (1500 l) ja niitä ruokittiin päivittäin kaupallisella kuivarehulla. Altaiden lämpötilaa ja happipitoisuutta seurattiin päivittäin.

Isolimakotilot (*Lymnaea stagnalis*) kerättiin käsin ja sukeltamalla Laukaan Vuojärvestä (N 6921037, E 445504) 24.6.2013 ja 8.7.2013. Kesäkuussa kerätyt kotilot käytettiin kalojen immunisointiin, ja heinäkuussa kerätyt kotilot kalojen uudelleenaltistamiseen (ks. alla). Vaippalimakotiloita (*Myxas glutinosa*) kerättiin 25.6.2013 kahdesta paikasta Konnevedestä, Pynnölänniemestä (N 6943701, E 467565) ja Jyväskylän yliopiston Konneveden tutkimusaseman rannasta (N 6943038, E 466589).

3.2. Kotiloiden käsittely

Aluksi määritettiin, mitkä kotilot olivat infektoituneet *D. pseudopathaceum* - tai *D. baeri* -loisella. Kotilot laitettiin huoneen lämpöön (n. 20 °C) lampun alle läpinäkyviin kertakäyttölaseihin (isolimakotilot 2,5 dl, vaippalimakotilot 2 dl). Muutaman tunnin kuluttua kotiloiden kerkariatuohtantoa tarkasteltiin valoa vasten. Loislajit tunnistettiin morfologisesti toukkien lepoasennon perusteella. *Diplostomum pseudopathaceum* -kerkaria-toukat taivuttavat häntänsä lajityypillisesti 90° kulmaan (Niewiadomska 1986), kun taas *D. baeri* -kerkaria-toukilla häntä on suora (Kuva 2). Muita loisia tuottavat ja loisetomat kotilot vapautettiin takaisin järveen. Kotiloita säilytettiin kokeiden ajan järvivedellä täytetyissä yhden litran rasioissa tai lasipurkeissa < 8 °C:ssa ja niitä ruokittiin salaattilla. Rasioiden ja purkkien vedet vaihdettiin viikoittain.

Kunkin isolimakotilon loisgenotyyppien lukumäärä määritettiin mikrosatelliittianalyysilla. Jokaisesta kotilosta poimittiin 20 kerkaria-toukkaa, jotka pakastettiin (-20 °C) 1,5 ml Eppendorf-putkiin, joissa oli 10 µl järvivettä (Louhi 2012). Kerkaria-toukkien genotyypitys tapahtui mikrosatelliittimarkkereilla (Louhi ym. 2010), jotka perustuvat tietyn *D. pseudopathaceum* -alleelin pituuteen (155/155 tai 145/155 nukleotidia). DNA:n eristykseen käytettiin pehmytkudoksille tarkoitettuja Chelex-piihelmiä, joiden pintaan epäpuhtaudet tarttuvat ja eristettävä DNA jää suspensioon. Näytteet sulatettiin ja niihin pipetoitiin 99 µl Chelex-helmiä ja 1 µl proteinaasi K:ta. Seoksia sekoitettiin ravistimella 15 sekuntia, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin kevyesti (6000 rpm, 1 s). Näytteitä inkuboitiin 2 h 56 °C:ssa, jonka jälkeen ne kiehautettiin proteinaasi K:n inaktivoimiseksi. Putket sentrifugoitiin jälleen kevyesti, jonka jälkeen DNA:ta sisältävää supernatanttia otettiin talteen 60 µl kuoppalevyille. PCR-monistamista varten uudelle kuoppalevyille pipetoitiin 2 µl DNA:ta ja 4 µl Mastermix-seosta, joka sisälsi nukleotideja, puskuriaineita, entsyymejä ja fluoresoivia alukkeita (F/R). PCR-monistaminen käynnistyi 15 minuutin jaksolla 95 °C:ssa, jonka jälkeen toistettiin 30 kertaa seuraavanlaista jaksoa: 0,5 min 94 °C:ssa, 1,5 min 56 °C:ssa ja 1 min 72 °C:ssa. Monistamisen jälkeen näytteet analysoitiin kapillaarisella ABI Prism 3130xl -analyysilaitteella ja kerkaria-toukkien genotyyppi määritettiin Peak Scanner 1.0 -ohjelmalla.

3.3. Ensimmäinen altistus (immunisointi)

Kokeen ensimmäisessä vaiheessa kalat altistettiin pienelle loismäärälle immuunivasteiden aikaan saamiseksi. Immunisointiin käytettiin satunnaisotos kerkaria-toukkia 11:sta isolimakotilosta ja 9:stä vaippalimakotilosta. Ennen kokeita kotilot otettiin kylmiöstä ja niille vaihdettiin n. 800 ml 17 °C järvivettä. Kotiloiden annettiin tuottaa kerkaria-toukkia 3 h ajan lampun alla, jonka jälkeen kaikkien kotiloiden tuottamat toukat yhdistettiin ja liuoksen kerkariatiheys määritettiin ottamalla 10 * 1 ml näytettä Petri-maljalle.

Immunisointia varten kalat (N = 1800) jaettiin satunnaisesti 12 läpivirtausaltaaseen, joiden tilavuus oli 1500 l. Koe käsitti kolme immunisointikäsitelyä sekä kontrollikäsitelyyn. Kalat (n = 150/allas) altistettiin joko *D. pseudospathaceum* -loiselle, *D. baeri* -loiselle tai näiden loisten sekoitukselle (suhde 50:50). Kontrolliryhmä ei saanut immunisointikäsitelyä. Jokaisella immunisointikäsitelyllä oli kolme toistoa (allasta). Altistuksen aikana altaiden vedentulo katkaistiin ja veden korkeus altaissa laskettiin 10 cm:iin. Vettä ilmastettiin ilmastimilla. Kerkaria-annos (10 kpl/kala, sekoituskäsitelyssä molempia loisia 5 kpl/kala, yhteensä 1500 kpl/allas) kaadettiin tasaisesti altaaseen. Kontrollialtaisiin kaadettiin vain vettä. Puolen tunnin kuluttua vedentulo avattiin ja altaiden annettiin täytyä. Kalojen immuunivasteen annettiin kehittyä 5 viikkoa, jonka aikana kaloja ruokittiin päivittäin kaupallisella kuivarehulla. Veden lämpötila oli kokeen ja ylläpidon aikana 17 °C.

3.4. Uudelleenaltistus

Viiden viikon kuluttua ensimmäisestä altistuksesta kalat altistettiin kymmenelle yksittäiselle *D. pseudospathaceum* -genotyypille (A–J) ja niistä satunnaisesti muodostetuille genotyyppipareille (AB, CD, EF, GH ja IJ) seuraavissa suhteissa (genotyyppi A:n suhde genotyyppi B:hen, vastaavasti): 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 ja 100:0 (Taulukko 1). Jokaisesta immunisointiryhmästä valittiin satunnaisesti 10 kalaa kutakin loisgenotyyppiä tai -paria ja suhdetta kohden. Kalat infektoitiin yksitellen 30 min ajan astioissa, joissa oli 0,5 l 17 °C vettä. Kerkaria-annos oli 100 kpl/kala ja käsittelyryhmät altistettiin satunnaisessa järjestyksessä. Infektoinnin jälkeen ryhmät siirrettiin erillisiin sumpuihin (35 x 35 x 35 cm), jotka asetettiin 1500 l:n kokoiisiin läpivirtausaltaisiin, joissa veden lämpötila oli 17 °C.

Kalat lopetettiin MS-222-nukutusaineen yliannostuksella ja tutkittiin aikaisintaan 48 tunnin kuluttua altistuksesta. Kalat punnittiin 0,1 g:n tarkkuudella ja kokonaispituus mitattiin 1 mm:n tarkkuudella, minkä jälkeen molemmat silmät preparoitiin tutkimuslaseille. Linssit eroteltiin lasiaisesta ja molemmat näytteet tutkittiin kahden lasin välissä preparointimikroskoopilla. Immunisoinnissa ja uudelleenaltistuksessa kaloihin tarttuneet loiset voitiin erottaa toisistaan koon perusteella. Yhdeksän kalaa hylättiin jatkotarkastelusta, koska niiden kokonaisloismäärää ei pystytty laskemaan toisen linssin tai lasiaisen rikkoutumisen takia.

Taulukko 1. Kahden genotyypin yhtäaikainen uudelleenaltistus. Soluissa on esitetty genotyyppien suhteelliset osuudet kussakin käsittelyryhmässä (*Diplostomum pseudospathaceum* -kerkaria-toukkien genotyyppien suhde). Jokaisessa genotyyppipari x immunisointi x suhde -käsittelyssä n = 10 ja koko kokeen n = 1000.

Genotyyppipari	Immunisointiryhmä			
	<i>D. pseudospathaceum</i>	<i>D. baeri</i>	Sekoitus	Kontrolli
A:B, C:D, E:F, G:H, I:J	0:100 n = 10	0:100 n = 10	0:100 n = 10	0:100 n = 10
A:B, C:D, E:F, G:H, I:J	25:75 n = 10	25:75 n = 10	25:75 n = 10	25:75 n = 10
A:B, C:D, E:F, G:H, I:J	50:50 n = 10	50:50 n = 10	50:50 n = 10	50:50 n = 10
A:B, C:D, E:F, G:H, I:J	75:25 n = 10	75:25 n = 10	75:25 n = 10	75:25 n = 10
A:B, C:D, E:F, G:H, I:J	100:0 n = 10	100:0 n = 10	100:0 n = 10	100:0 n = 10

3.5. Tilastolliset menetelmät

Loisten ja genotyyppien esiintymistä kotiloissa kuvattiin laskemalla kullekin näytteenotto paikalle prevalenssi l. loisittujen kotiloiden osuus koko näytteestä sekä yksittäisillä genotyypeillä loisittujen kotiloiden osuus kaikista loisituista kotiloista. Myös loisten infektiivisyys l. kalaan tarttuneiden loisten osuus altistetuista loisista laskettiin.

Kalojen pituuden (L) ja massan (W) välistä riippuvuutta mallinnettiin potenssifunktiolla $W = aL^b$ (Le Cren 1951). Havainnoille tehtiin ln-muunnos, ja niihin sovitetiin lineaarisella regressiolla funktio $\ln(W) = \ln(a) + b \cdot \ln(L)$. Pituus-massa-regression avulla selvitetiin, esiintyikö aineistossa massaltaan tai pituudeltaan poikkeavia yksilöitä, jotka olisivat voineet vaikuttaa loismäärien tulkintaan. Kalojen pituuden ja massan eroja immunisaatioryhmien välillä testattiin 1-suuntaisella ANOVA:lla. Kalojen pituuden ja uudelleenaltistuksessa kalaan päätyneiden *D. pseudospathaceum* -loisten määrän välistä korrelaatiota testattiin Spearmanin korrelaatioanalyysillä. Uudelleenaltistuksessa kunkin kotilon tuottaman kerkaria-toukkatiheyden ja kussakin immunisointiryhmässä vastaavan genotyypin keskimääräisen menestyksen välistä korrelaatiota testattiin Pearsonin korrelaatiokertoimella, koska otosten varianssit olivat samansuuruisia.

Immunisointiryhmien välisiä eroja *D. pseudospathaceum* -genotyyppien tartuntamenestyksessä analysoitiin kovarianssianalyysillä (ANCOVA). Selittävinä tekijöinä mallissa olivat immunisointiryhmä, loisgenotyyppi sekä näiden tekijöiden yhdysvaikutustermi. Kalan pituus korreloi loisten määrän kanssa ja se huomioitiin mallissa kovariaattina. Immunisointiryhmä oli kiinteä tekijä (fixed factor) ja loisgenotyyppi satunnaistekijä (random factor).

Immunisointiryhmien välisiä eroja linsseihin päätyneiden loisten lukumäärää genotyyppien yhtäaikaisessa infektiossa tarkasteltiin yleistetyllä lineaarisella mallilla (GLM), jonka vertailujakaumana käytettiin negatiivista binomijakaumaa ja loglink-funktioita. Tämä malli antoi parhaan sopivuuden aineistoon. Analyysiä varten suhderyhmät 0:100 ja 100:0 (yksittäiset genotyypit) sekä 25:75 ja 75:25 yhdistettiin, koska ne vastasivat samaa käsittelyä tilanteessa, jossa kotiloparit oli muodostettu satunnaisesti. Mallissa

selittävinä tekijöinä olivat immunisointiryhmä, genotyyppien suhde, genotyyppipari sekä näiden kaksi- ja kolmisuuntaiset yhdysvaikutustermit. Kovariaattina oli kalan pituus. Jatkotarkasteluina immunisaatioryhmien eroja testattiin genotyyppisuhteiden sisällä.

4. TULOKSET

4.1. Loisten prevalenssi luonnossa ja infektiivisyys kokeen aikana

Diplostomum pseudopathaceum -loisen prevalenssi (loisittujen yksilöiden osuus koko näytteestä) oli isolimakotiloissa Vuojärvestä kesä-heinäkuussa hyvin alhainen (Taulukko 2). Loisituista kotiloista suurin osa oli lisäksi infektoitunut vain yhdellä *D. pseudopathaceum* -genotyypillä. *D. baeri* -loisen prevalenssi Konnevedellä oli kummassakin keräyspaikassa selvästi korkeampi.

Ensimmäisessä altistuksessa *D. pseudopathaceum* -immunisointiryhmässä kalojen linsseihin asetui 10 loisen annoksesta keskimäärin 9,86 loista (Taulukko 3). *D. baeri* -loisista keskimäärin joka seitsemäs toukka onnistui tarttumaan kalaan.

Taulukko 2. *Diplostomum pseudopathaceum* -loisen esiintyminen Laukaan Vuojärvestä kerätyissä *Lymnaea stagnalis* -kotiloissa sekä *D. baeri* -loisen esiintyminen Konnevedeltä kerätyissä *Myxas glutinosa* -kotiloissa kesällä 2013. Prevalenssi kuvaa loisittujen yksilöiden osuutta näytteessä.

Paikka	Ajankohta	Kotiloita (n)	Loisittuja kotiloita (n)	Prevalenssi (%)	Loisittu yhdellä genotyypillä (%)
Vuojärvi	24.6.2013	329	11	3,3	63,6
Vuojärvi	8.7.2013	352	14	4,0	100,0
Pynnölänniemi	25.6.2013	42	6	14,3	-
Tutkimusaseman ranta	25.6.2013	38	5	13,2	-

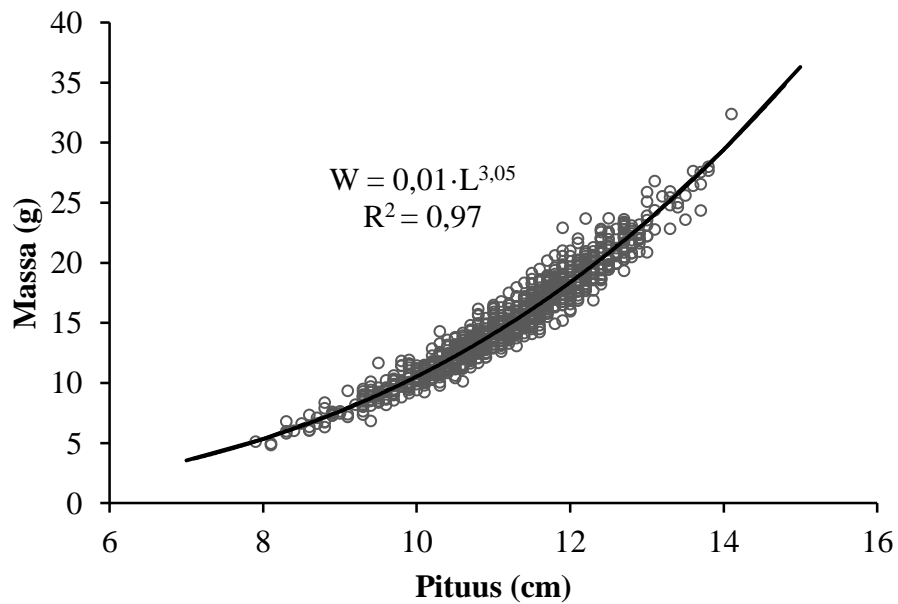
Taulukko 3. Kerkaria-toukkien infektiivisyys altistettaessa nuoria kirjolohia ensimmäistä kertaa *Diplostomum pseudopathaceum* - ja *D. baeri* -loisille sekä niiden sekoitukselle. Loisannos kuvaa loismäärää, jolle kukin kala on keskimäärin altistettu. Loisten määrän keskiarvot ja keskihajonnat on laskettu täysin kehittyneistä metakerkaria-toukista toisen altistuksen jälkeen elokuun 2013 alussa.

Immunisointiryhmä	Loisannos (kpl)	Keskiarvo	Keskihajonta	Infektiivisyys (%)
<i>D. pseudopathaceum</i>	10	9,86	3,76	98,6
<i>D. baeri</i>	10	1,72	1,59	17,2
sekoitus, <i>D. pseudopathaceum</i>	5	4,60	2,27	92,0
sekoitus, <i>D. baeri</i>	5	0,74	0,94	14,8

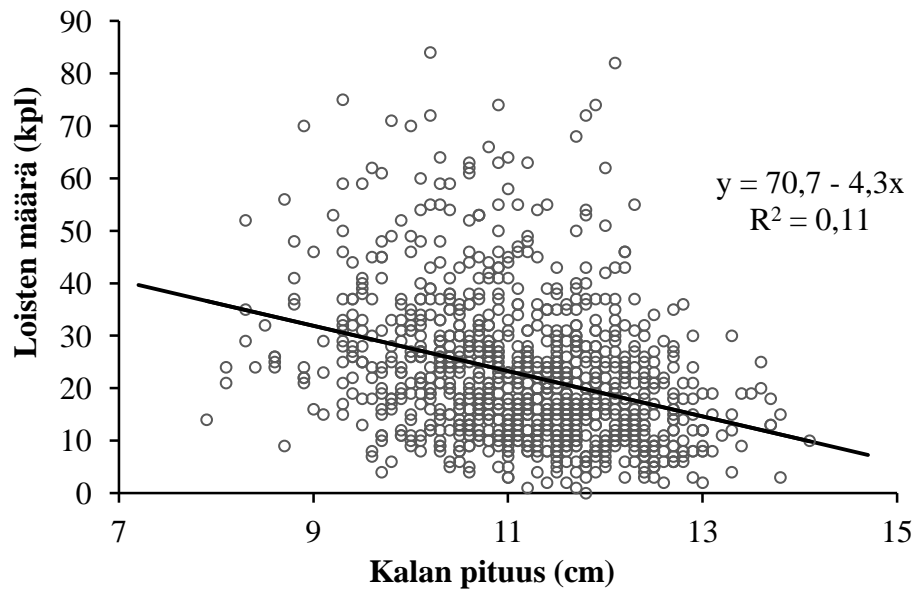
4.2. Kalan koon ja kerkariatutannon vaikutus loismäärään

Kalojen keskipituus toisen loisaltistuksen jälkeen oli 111 mm \pm 0,03 SE (vaihteluväli 79–141 mm) ja keskimassa 15,1 g \pm 0,13 SE (vaihteluväli 4,8–32,4 g). Kalojen pituus ei eronnut merkitsevästi eri immunisointiryhmien välillä (ANOVA: N = 1000, $F_{3,996} = 0,312$, $p = 0,817$). Myöskään kalojen massassa ei havaittu merkitsevää eroa immunisointiryhmien välillä (ANOVA: N = 1000, $F_{3,996} = 1,027$, $p = 0,380$). Kalan pituuden ja massan välillä oli allometrinen eli epälineaarinen riippuvuus (Kuva 3). Uudelleenaltistuksessa *D.*

pseudospathaceum -loisten määrä korreloi negatiivisesti kalan pituuden kanssa (Spearman: $N = 991$, $\rho = -0,35$, $p < 0,001$, Kuva 4) eli suurempiin kaloihin tarttui vähemmän loisia.



Kuva 3. Kirjolohien ($n = 1000$) pituuden (L) ja massan (W) välinen allometrinen riippuvuus ja sitä kuvaava potenssifunktio.



Kuva 4. Uudelleenaltistuksessa kirjolohien ($n = 991$) linssiin asettuneiden *D. pseudospathaceum* -loisten määrän ja kalan pituuden välinen lineaarinen regressio.

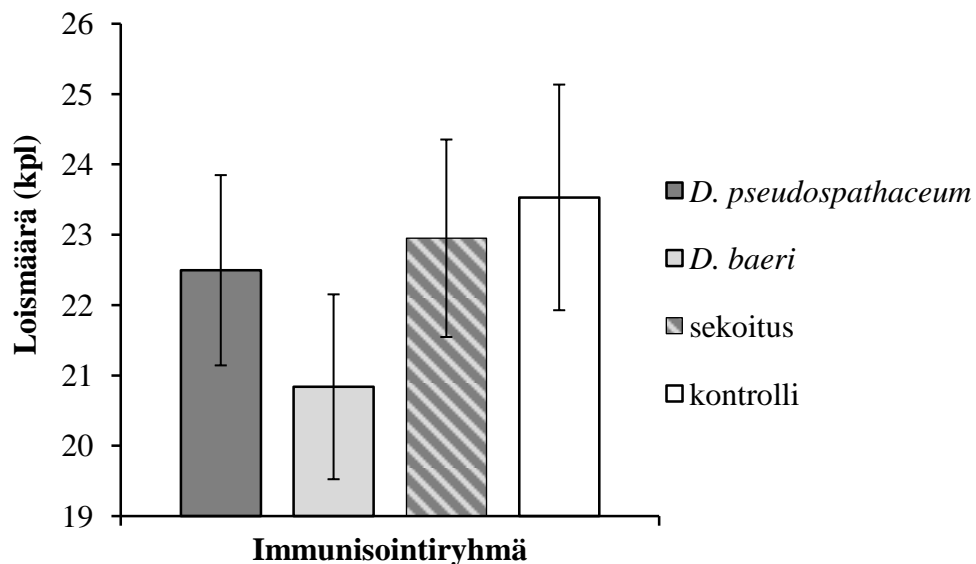
Uudelleenaltistuksessa kotiloiden tuottamien kerkaria-toukkien tiheyden ja vastaavien loisgenotyyppien tartuntamenestyksen välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta (Taulukko 4). Genotyypin kotilossa tuottamien kerkaria-toukkien määrä ei siis vaikuta ko. genotyypin tartuntamenestykseen kalassa.

Taulukko 4. Uudelleenaltistuksessa käytettyjen kotiloiden tuottaman *Diplostomum pseudospathaceum* -kerkaria-toukkatiheyden ja niitä vastaavien loisgenotyyppien keskimääräisen tartuntamenestyksen (kaloissa havaitun loismäärän) välinen riippuvuustarkastelu Pearsonin korrelaatiokertoimella r .

Immunisointiryhmä	n	r	p
kontrolli	10	0,229	0,525
<i>D. pseudospathaceum</i>	10	0,138	0,704
<i>D. baeri</i>	10	0,037	0,920
sekoitus	10	0,006	0,986

4.3. Altistushistorian vaikutus *D. pseudospathaceum* -loisen tartuntamenestykseen

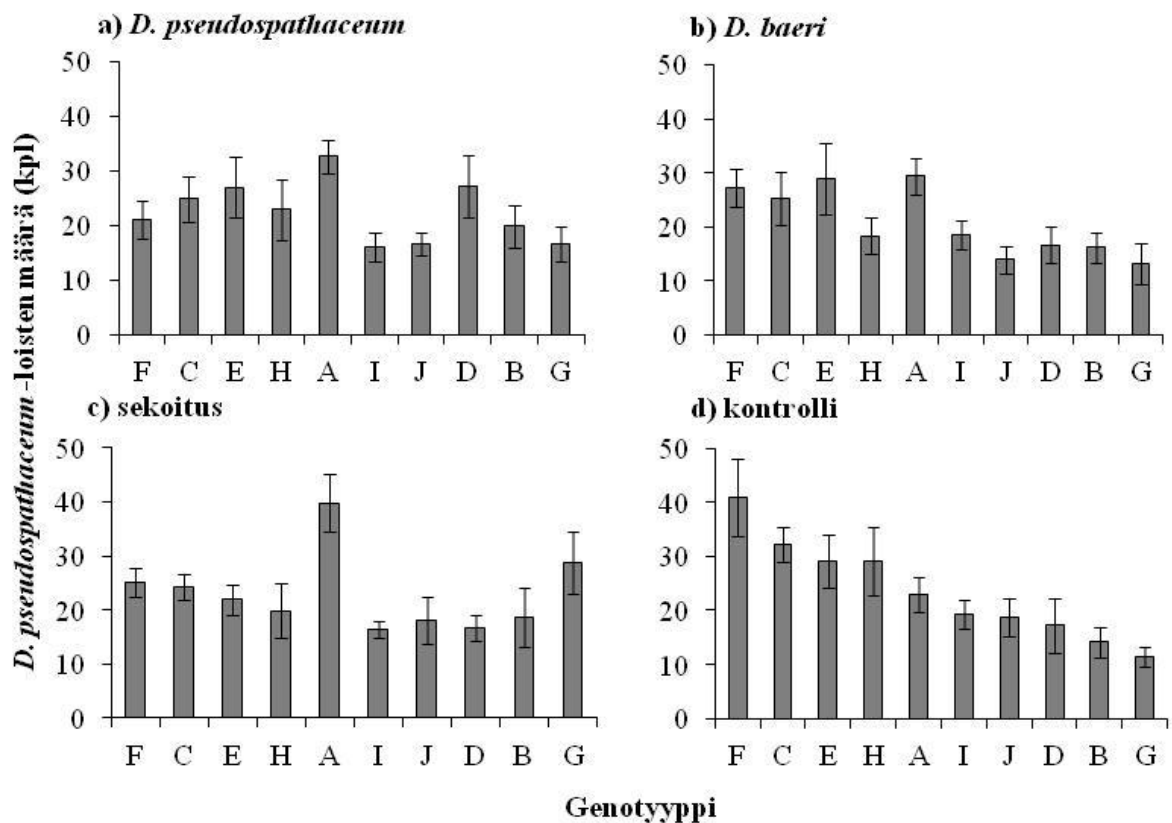
Uudelleenaltistuksessa suurimmat loismäärät havaittiin kontrolliryhmän kaloissa (Kuva 5). *Diplostomum baeri* -immunisointiryhmässä loisia oli keskimäärin vähiten. Immunisointiryhmien väliset erot loisten määrässä eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä (Taulukko 5). Sen sijaan loisen genotyypillä (Kuva 6) ja kalan pituudella oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus loisten tartuntamenestykseen eri immunisointiryhmissä. Loisen genotyypin ja immunisointiryhmän yhdysvaikutustermi on tilastollisesti suuntaa-antava ($p = 0,065$). Tämä osoittaa, että genotyyppien tartuntamenestyksessä oli paljon vaihtelua, eikä mikään genotyypeistä menestynyt yhtä hyvin kaikissa immunisointiryhmissä. Esimerkiksi genotyypin A menestys oli heikointa kontrolliryhmässä, kun taas genotyyppi F menestyi kontrolliryhmän kaloissa paremmin kuin muissa immunisaatioryhmissä (Kuva 6).



Kuva 5. Uudelleenaltistuksessa eri immunisointiryhmien kaloihin asettuneiden *D. pseudospathaceum* -loismäärien keskiarvot (\pm keskivirhe). Loismäärä kuvaa ainoastaan yksittäisille loisgenotyypeille altistettujen kalojen keskimääräistä loismäärää.

Taulukko 5. ANCOVA:n tulokset kokeesta, jossa eri tavoin immunisoidut kirjoloheet altistettiin uudelleen *D. pseudospathaceum* -loisen yksittäisille genotyypeille. Terminä kalan pituus (kovariaatti), immunisointiryhmä (IR), loisen genotyyppi (G, random factor) ja niiden välinen yhdysvaikutustermi (IR * G).

Termi	df ₁	df ₂	F	p
pituus	1	355	65,396	<0,001
immunisointiryhmä	3	27	0,601	0,620
genotyyppi	9	27	6,545	<0,001
IR * G	27	355	1,468	0,065



Kuva 6. *D. pseudospathaceum* -loisen genotyyppien (A-J) tartuntamenestys kussakin immunisointiryhmässä uudelleenaltistuksen jälkeen (\pm keskivirhe). Genotyypit on järjestetty kaikissa kuvissa sen mukaan, kuinka hyvin ne infektoivat kontrolliryhmän kaloja.

4.4. Immunisointitaustan vaikutus genotyyppien välisiin vuorovaikutussuhteisiin

Diplostomum pseudospathaceum -loisen tartuntamenestykseen vaikutti kalan pituuden lisäksi kalan immunisaatiotausta sekä genotyyppipari (Taulukko 6). Immunisaatiotaustan merkitsevä vaikutus tartuntamenestykseen johtuu siitä, että kontrollikaloilla oli korkein loismäärä. Immunisaatioryhmän, genotyyppien suhteen sekä genotyyppiparin välinen yhdysvaikutustermi oli myös merkitsevä, mikä osoittaa, että

genotyypikombinaatioiden tartuntamenestys riippui siitä, missä suhteessa ne infektoivat tartuntahistorialtaan erilaisia isäntiä.

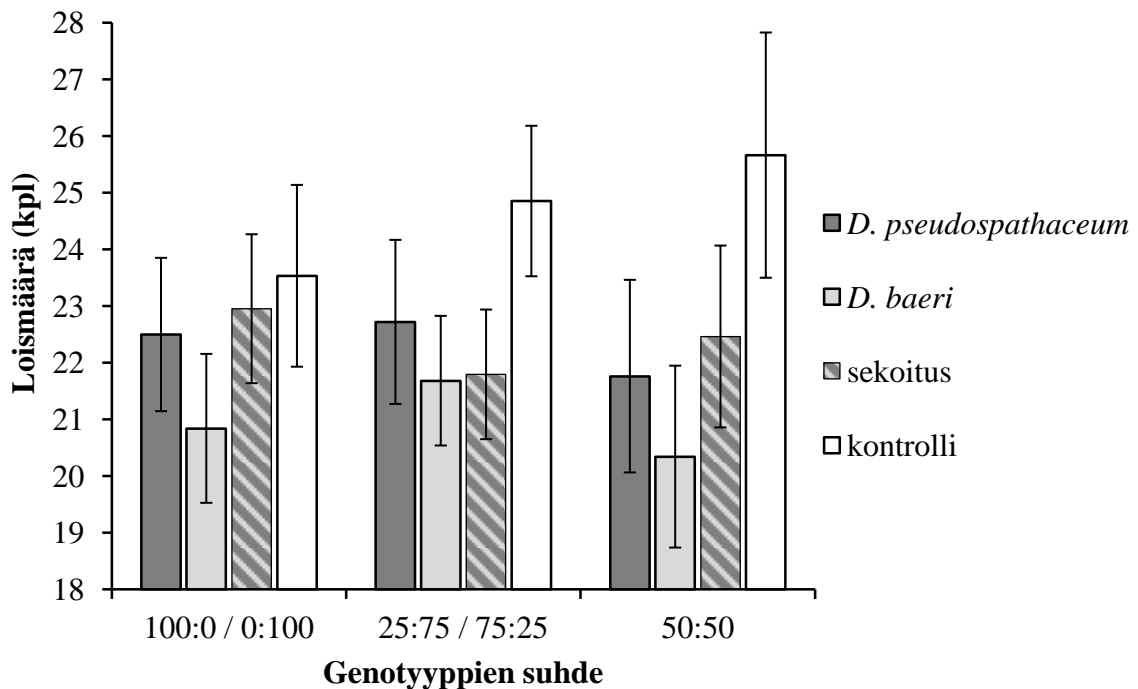
Taulukko 6. Yleistetyn lineaarisen mallin (GLM) tulokset kokeesta, jossa immunisoidut kalat altistettiin *D. pseudopathaceum* -loisen kahdelle eri genotyypille samanaikaisesti kolmessa eri suhteessa (100:0/0:100, 75:25/25:75 ja 50:50). Termeinä immunisointiryhmän lisäksi genotyyppien suhde (GS) ja genotyypipari (GP) ja niiden 2- ja 3-suuntaiset yhdysvaikutustermit.

Termi	df ₁	Wald χ^2	p
kalan pituus	1	145,1	<0,001
immunisointiryhmä (IR)	3	15,4	0,002
genotyyppien suhde (GS)	1	0,1	0,767
genotyypipari (GP)	4	42,2	<0,001
IR * GS	3	3,2	0,361
IR * GP	12	8,9	0,711
GS * GP	4	9,0	0,062
IR * GS * GP	12	25,5	0,013

Immunisaatiotaustan vaikutus *D. pseudopathaceum* -loisen tartuntamenestykseen oli merkitsevä, kun kala altistui kahdelle eri genotyypille yhtäaikaista (Taulukko 7). Tämä johtui siitä, että immunisoimattomien kontrollikalorien loismäärät olivat korkeampia kuin immunisoitujen kalorien kahdelle loisgenotyypille altistettaessa riippumatta genotyyppien sekoitussuhteesta (Kuva 7). Se, että kalalla oli aiempi loistartunta, vaikutti siis heikentävästi kahden genotyypin yhtäaikaista tartuntamenestykseen ja tulos oli riippumaton immunisaatiotaustasta. Immunisaatiotaustan lisäksi loisgenotyyppien yhtäaikaista tartuntamenestykseen vaikutti merkitsevästi genotyypipari, mikä osoittaa, että pareilla oli vaihteleva kyky infektoida kutakin kalaisäntää. Kun molempia genotyyppejä oli suhteessa yhtä paljon (50:50), myös immunisaatiotaustan ja genotyypiparin välinen yhdysvaikutustermi oli merkitsevä. Tämä tarkoittaa, että genotyypiparien tartuntamenestys vaihteli merkitsevästi riippuen kalan ensin kohtaamista loisista.

Taulukko 7. Yleistettyjen lineaaristen mallien (GLM) tulokset kokeesta, jossa immunisoidut kalat altistettiin *D. pseudopathaceum* -loisen kahdelle eri genotyypille samanaikaisesti kolmessa eri suhteessa (100:0/0:100, 75:25/25:75 ja 50:50). Ryhmien 100:0 ja 0:100 sekä 75:25 ja 25:75 havainnot on yhdistetty. Kullekin genotyypisuhteelle erikseen tehdyn GLM-mallin termeinä immunisointiryhmä (IR), genotyypipari (GP) sekä niiden välinen yhdysvaikutustermi.

Genotyyppien suhde	n	Termi	df ₁	Wald χ^2	p
100:0/0:100	396	kalan pituus	1	45,9	<0,001
		immunisointiryhmä (IR)	3	0,9	0,835
		genotyypipari (GP)	4	29,8	<0,001
		IR * GP	12	14,3	0,281
75:25/25:75	395	kalan pituus	1	30,9	<0,001
		immunisointiryhmä (IR)	1	8,4	0,004
		genotyypipari (GP)	4	36,8	<0,001
		IR * GP	12	3,2	0,522
50:50	200	kalan pituus	1	41,9	<0,001
		immunisointiryhmä (IR)	3	10,4	0,016
		genotyypipari (GP)	4	21,4	<0,001
		IR * GP	12	23,1	0,027



Kuva 7. *Diplostomum pseudopathaceum* -toukkien määrä immunisaatioryhmittäin kussakin loisgenotyyppien suhderyhmässä (\pm keskivirhe).

5. TULOSTEN TARKASTELU

Isännät altistuvat elämänsä aikana tyypillisesti useille loisgenotyypeille (Louhi ym. 2013), joiden väliset vuorovaikutukset voivat ilmetä molempien genotyyppien menestymistä rajoittavana kilpailuna (Rauch ym. 2008) tai molempien menestystä edistävänä yhteispelinä (Karvonen ym. 2012b). Isännän immuniteetti laskee yleensä loisen tartuntamenestystä seuraavassa kohtaamisessa (Karvonen ym. 2005), mutta on kuitenkin epäselvää, kuinka isännän tartuntahistoria ja sen aikaansaama immuniteetin kehittyminen vaikuttavat loisten välisiin vuorovaikutuksiin. Tutkielmassani selvitin, miten isäntäkalojen immunisointi vaikuttaa *Diplostomum pseudospathaceum* -imumatoloisen genotyyppien väliseen tartuntamenestykseen. Käytin kalojen immunisaatioon *D. pseudospathaceum* - ja *D. baeri* -loista sekä näiden sekoitusta, joilla luotiin erilaisia immunisaatiotaustoja vastaamaan luonnossa esiintyvää vaihtelua isäntien altistumisessa loisille. Havaitsin, että loisgenotyypit erosivat merkittävästi kyvyssään infektoida immuunitaustaltaan erilaisia isäntiä. Kahden genotyypin yhtäaikainen tartuntamenestys oli huonompi loisille aiemmin altistetuissa isännissä kuin altistamattomissa kontrollikaloissa, mikä osoittaa, että loisten menestyminen isännässä riippuu isännän tartuntahistoriasta sekä loispopulaation geneettisistä ominaisuuksista.

5.1. Genotyyppien väliset erot tartuntamenestyksessä

Genotyyppien välillä esiintyi merkittäviä eroja tartuntamenestyksessä ja genotyypit menestyivät eri tavoin eri immunisaatioryhmissä. Tulos siis viittaa vahvasti siihen, että loisgenotyyppien välillä esiintyi merkittävää geneettistä vaihtelua niiden kyvyssä infektoida erilaisia isäntien immuunitaustoja. Isännän ja loisen koevoluution tuloksena loisen kelpoisuutta edistävien ominaisuuksien, kuten transmission onnistumisen ja lisääntymisen, tulisi korostua (Schmid-Hempel 2011). Teoriassa luonnonvalinnan tulisi karsia vaihtelua näissä piirteissä poistamalla kelpoisuudeltaan heikompia alleleja populaatiosta (Roff 1997). Loinen elää kuitenkin isännän sisällä, missä sen elinympäristön epäennustettavuutta lisäävät isännän aiemmat infektiot ja sitä kautta hankittu immuniteetti sekä samanaikaisesti infektoivat loislajit ja -genotyypit (Seppälä ym. 2009, 2012). Luonnonvalinta voi em. ilmiöiden pohjalta pitää yllä geneettistä vaihtelua loisen infektiopiirteissä, mikä tukee ajatusta siitä, että tässä työssä tutkittu isännän tartuntahistoria voi vaikuttaa loisten geneettiseen monimuotoisuuteen. Tuloksen mukaan genotyypit eivät siis pärjää yhtä hyvin kaikissa isännän immunisaatiotaustoissa, mutta loinen voi tehostaa transmission onnistumista mm. kasvattamalla kotiloista vapautuvien kerkaria-toukkien määrää (Karvonen ym. 2003). Loisen lisääntymispotentiaali kotilossa kasvattaakin sopivan isännän kohtaamisen todennäköisyyttä, vaikka kerkaria-toukkatuotannon määrän lisääminen ei kasvattaisikaan loismääriä yksittäisessä isännässä. On myös tärkeää todeta, että kukin genotyyppi pyrkii maksimoimaan vain oman onnistumisensa, jolloin vain transmissiovaiheesta ja seuraavaan kehitysvaiheen läpäisystä selvinneet loiset pääsevät lisääntymään ja säilyttämään geneettisen perimänsä loispopulaatioissa.

Periaatteessa genotyyppien väliset erot tartuntamenestyksessä voivat johtua myös isännän ominaisuuksista, edellisen isännän kunnosta sekä ympäristön aiheuttamasta vaihtelusta (Seppälä ym. 2007). Kaikki näissä kokeissa käytetyt kirjolohet olivat kuitenkin peräisin samasta parvesta, joten niiden immuniteetin kehittyminen oli todennäköisesti hyvin samanlaista. Lisäksi kuhunkin käsittelyryhmään käytettiin kymmenen satunnaisesti valikoitua kalaa, mikä poistaa tai ainakin merkittävästi vähentää isännästä tulevaa vaihtelua. Kokeissa käytettyjä kotiloita myös ruokittiin ja säilytettiin samalla tavalla, minkä tulisi minimoida kotiloisännän kunnosta johtuvaa vaihtelua (Seppälä ym. 2015). Ympäristön vaihtelu oli infektiotietokellä niin ikään vakioitu kalojen ja käsittelyryhmien

välillä. Tämä tukee sitä, että havaitut erot ovat todennäköisesti peräisin loisen geneettisistä ominaisuuksista.

Kalan pituus vaikutti *D. pseudospathaceum* -loisen määriin negatiivisesti. Tämä voi johtua siitä, että kalan ihon tai kidusepiteelin lävistävien *Diplostomum* -kerkaria-toukkien on vaellettava kohteeseensa vuorokauden kuluessa tai muuten niiden energiavarastot ehtyvät (Karvonen ym. 2012a). Suuremmassa kalassa loisen matka silmään on pidempi kuin pienemmässä kalassa, joten joidenkin toukkien energia ehtii siis todennäköisesti hiipua ennen kohteen saavuttamista. Luonnossa sen sijaan suuremmilla ja vanhemmilla kaloilla on yleensä enemmän loisia verrattuna pieniin kaloihin, koska ne ovat altistuneet loisille pidemmän aikaa (Poulin 2000). Tässä työssä kaikki kalat olivat saman ikäisiä ja altistuneet samalle määrälle loisia samanaikaisesti, joten selitys loismäärien suurelle vaihtelulle löytyy muista tekijöistä kuten kalojen kokoeroista. Tässä tutkimuksessa immunisointi ei vähentänyt merkittävästi linssiin päätyneiden loisten määrää genotyyppien yksittäisissä infektioidissa, kun taas muissa tutkimuksissa ero kontrollikalojen ja immunisoitujen kalojen loismäärissä oli 30% (Rellstab ym. 2013) tai jopa 85% (Karvonen ym. 2005). Karvosen ym. (2005) tulosta ei voi kuitenkaan suoraan verrata omien tulosteni kanssa, koska heidän kokeessaan immunisoidut kalat olivat pintavesilaitoksessa kasvaessaan altistuneet todennäköisesti muillekin loisille ja kehittäneet jo laaja-alaisesti hankittua immuniteettia. Lisäksi kalat olivat n. 30% pienempiä kuin tämän tutkimuksen kalat, joten Karvosen ym. (2005) kokeen kontrollikaloilla on saattanut olla heikompi synnynnäinen immuniteetti, koska varhaisessa kehitysvaiheessa somaattiseen kasvuun panostaminen voi parantaa hengissä säilymistä.

5.2. Kahden genotyypin yhtäaikaiset infektiot ja niiden merkitys

Isännän immuunijärjestelmän toiminta ja ylläpito vaativat paljon resursseja (Schmid-Hempel 2011). Kalan synnynnäinen puolustusjärjestelmä perustuu hankitun immuniteetin tavoin vieraiden rakenteiden tunnistamiseen (Jokinen 2012) ja puolustukseen tarvittavien resurssien määrä voi kasvaa mitä enemmän vieraita rakenteita se kohtaa (Jokela ym. 2000). Tämä tarkoittaa, että isännän altistuminen useille loisen genotyypeille yhtäaikaisesti voi kuormittaa synnynnäistä immuunijärjestelmää. Tulokseni, joissa *D. pseudospathaceum* -loisen tartuntamenestys oli korkeampi kahden genotyypin yhtäaikaisessa infektiossa kuin yksittäisen genotyypin infektiossa immunisoimattomilla kaloilla, tukevat tätä teoriaa. Myös Karvonen ym. (2012b) havaitsivat loisten korkeamman tartuntamenestyksen yhteisinfektiossa, mikä todennäköisesti johtuu juuri synnynnäisen immuunijärjestelmän kuormittumisesta. Tämän työn keskeisin tulos oli, että kahden yhtä aikaa infektoivan genotyypin saavuttama hyöty tartuntamenestyksessä katosi isännän immunisoinnin myötä, mikä viittaa genotyyppien välisestä yhteispelistä saatavan hyödyn romuttumiseen immunisoiduissa kaloissa. Hankittu immuniteetti voi siis mahdollisesti kompensoida epäspesifisen immuniteetin kuormittumista. Tämä on merkittävää, ja sillä voi olla keskeinen rooli mm. loisten infektiotategioiden evoluution kannalta.

Miksi immunisoiduissa kaloissa loisen genotyyppien yhteispelistä ei ole hyötyä? Jos genotyyppien yhteispelin paremmuus pohjautuu vain isännän immuunijärjestelmän kuormittumiseen, ei sama taktiikka välttämättä toimi enää siinä vaiheessa, kun isäntä on jo kohdannut samoja loisia aiemmin, koska spesifinen immuniteetti alentaa loisten tarttumista (Karvonen ym. 2005). Vaikka tutkimuksessani ei suoraan mitattu kalan immunologiaa vasteita, on todennäköistä, että kirjolohet kehittivät loisen ensimmäisessä kohtaamisessa spesifisen immuniteetin, joka vaikutti seuraavien loisen genotyyppien menestykseen. Kun isännän immuunivaste hankaloittaa loisten tarttumista kalaan, genotyyppien väliset vuorovaikutukset voivat muotoutua enemmän kilpailun kuin yhteispelin suuntaan (Rauch

ym. 2008). Kilpailulla voi olla merkitystä mm. loisen virulenssin evoluution kannalta (van Baalen & Sabelis 1995). Esimerkiksi, virulentimpi bakteerigenotyyppi voi menestyä spesifistä immunitettia vastaan paremmin kuin vähemmän virulentti genotyyppi, koska se jakaantuu nopeammin, jolloin sen määrä isännässä on suurempi (Råberg ym. 2006). Toisaalta on mahdollista, että useiden genotyyppien yhtäaikaisessa infektiossa hankittu immuunijärjestelmä ei torju jokaista genotyyppiä yhtä tehokkaasti (Taylor ym. 1998). Immuunipuolustuksen vastustus voi esimerkiksi olla suurin hyökkäävämpää l. virulentimpia genotyyppiä kohtaan, jolloin vähemmän virulentti genotyyppi voikin menestyä paremmin (Råberg ym. 2006). *Diplostomum* -loisilla virulenssia eli isännälle aiheutunutta haittaa kalassa voidaan periaatteessa mitata linssiin päätyvien loisten määrällä, koska suurempi loismäärä heikentää kalan näkökykyä enemmän (Karvonen ym. 2004a). Genotyyppien runsaussuhteita linsseissä infektion jälkeen ei kuitenkaan määritetty tässä työssä, joten ei tiedetä, hyötyivätkö tai kärsivätkö molemmat loiset samalla tavoin tai miten genotyypit erosivat tarttumiskyvyssään yhteisinfektiossa.

Kalassa jo olevat loiset vaikuttavat siis uusien loisten tarttumiseen vähentämällä yhteisinfektiosta saatavaa hyötyä, mutta toisaalta genotyyppien yhteisinfektiosta voi silti olla loiselle hyötyä pääisäntään siirtyessä. Loisten väliset vuorovaikutukset vaikuttavat isännän alttiuteen uusille infektiolle muuntamalla immuunivasteen tehokkuutta (Telfer ym. 2010), minkä seurauksena jotkin isännät voivat herkistyä useiden genotyyppien vaiheittaisille yhteisinfektiolle geneettisten, immunologisten tai isännän kunnosta riippuvien erojen takia (Taylor ym. 1998, Jokela ym. 2000, Krasnov ym. 2005). Nämä seikat voivat johtaa luonnossa usein havaittuun tilanteeseen, jossa loisten prevalenssi isäntäpopulaatiossa on suuri, mutta loiset ovat keskittyneet l. aggregoituneet harvoin isäntäyksilöihin (Valtonen ym. 2012). *Diplostomum* -loisen tapauksessa loisten aggregoituminen harvoin kalayksilöihin tarkoittaa sitä, että niistä siirtyy kerralla suuri määrä geneettisesti erilaisia loisen toukkia pääisäntään. Tämä strategia takaa loiselle geneettisesti erilaisen lisääntymiskumppanin pääisännässä tapahtuvaa suvullista lisääntymistä varten, jolloin loinen voi välttää sisäsiitoksesta muuten koituvia ongelmia (Rauch ym. 2005). Geneettisen monimuotoisuuden kasvattaminen silmässä voi siis olla *Diplostomum* -loisille hyödyllistä. Lisäksi kalan silmään mahtuu jopa satoja loistoukkia, jolloin niiden ei tarvitse edes kilpailla tilasta.

Diplostomum pseudospathaceum -loisen aiheuttaman kaihin peittävyys on suoraan suhteessa linsissä olevien loisten määrään (Karvonen ym. 2004a), ja näkörajoitteinen kala on alttiimpi päätyämään pääisännän ravinnoksi (Seppälä ym. 2004). Loisen kannalta olisikin edullisempaa, että useat genotyypit onnistuisivat mahdollisimman hyvin isäntään tartumisessa. Mutta koska kala kehittää immunitetin loista vastaan jo vähäisellä altistumisella (Karvonen ym. 2005), kannattaisi loisen iskeä nimenomaan vastustuskyvyttömiin isäntiin samanaikaisesti muiden genotyyppien kanssa. Tämä on mahdollista esim. alkukesästä, jolloin järvien rantavyöhykkeellä on suuria määriä immuunitoiminnan kannalta kokemattomia kalanpoikasia. Kalat voivat altistua useille genotyypeille, jos kotilossa on samaan aikaan kaksi tai useampia genotyyppiä (Louhi ym. 2013), koska näin useiden genotyyppien yhtäaikaisen infektion todennäköisyys kalaisäntään kasvaa ja tartuntamenestys kohoaa. Toisaalta genotyyppien yhtäaikainen infektio kotilossa tuottaa vähemmän kerkaria-toukkia genotyyppiä kohden kuin jos ne olisivat kotilossa yksin (Karvonen ym. 2012b), mikä taas huonontaa niiden mahdollisuuksia kohdata sopiva kalaisäntä (Karvonen ym. 2003). Loisen kannalta edullisin tilanne olisi jos genotyyppien yhtäaikainen infektio syntyy siten, että kaksi eri loisgenotyyppiä tuottavaa kotiloa sijaitsevat lähekkäin ja kala ui niiden lähistöllä.

Geneettisillä vuorovaikutuksilla voi näin olla merkittävä rooli loisen infektiostراتيجioiden muotoutumisessa.

On yllättävää, että immunisaation vaikutusta ei havaittu yksittäisinfektioissa, vaikka kahden genotyypin yhtäaikaisissa infektioiden kontrolliryhmän loismäärä oli merkittävästi suurempi verrattuna immunisoituihin ryhmiin. On mahdollista, että tässä tutkimuksessa spesifisen immunitetin kehittyminen ei ollut täydellistä, ja kalat vastustivat loisia osittain synnynnäisen immunitetin turvin (Karvonen ym. 2009, 2010). Toisaalta merkittäviä eroja ei tällöin tulisi havaita myöskään kahden genotyypin yhtäaikaisissa infektioiden. Viisi viikkoa on yleensä riittävä aika spesifisen immunitetin muodostumiseen (Aaltonen ym. 1994, Rellstab ym. 2013), mutta tämä riippuu mm. lämpötilasta. Esimerkiksi Whyte ym. (1987) havaitsivat spesifisten vasta-aineiden muodostumisen vasta kuusi viikkoa kerkaria-toukille altistumisen jälkeen 14 °C:ssa. Tässä työssä lämpötila oli 17 °C. Stressi voi heikentää immuunivasteiden kehittymistä (Espelid ym. 1996), mutta on epätodennäköistä, että vain kontrollikalat olisivat tässä työssä stressanneet muita käsitteilyitä enemmän, koska kaikkia kaloja käsiteltiin samalla tavalla.

5.3. Loislajien väliset vuorovaikutukset

Ristikkäisresistenssillä tarkoitetaan isännän bakteeria, virusta tai tässä tapauksessa monisoluisia loisia vastaan kehittämää immunitettia, joka alentaa toisen loislajin (Porrozzini ym. 2004) menestystä isännässä. Isännän kannalta on edullista, jos spesifisen immunitetin perustana olevat tunnistusreseptorit kykenevät jonkin asteiseen ristiin tunnistamiseen (engl. *cross-reactivity*, Schmid-Hempel 2011). Tällöin yhdelle loislajille immunitetin kehittänyt isäntä kykenee vastustamaan samoilla resursseilla ainakin osittain myös toista, pintarakenteiltaan samankaltaista loislajia (Jackson & Tinsley 2003). *Diplostomum*-kirjolohi-systeemissä kala kehittää ainakin *D. pseudopathaceum*-kerkaria-toukkia vastaan spesifisiä vasta-aineita (Whyte ym. 1987), jotka toimivat samalla tavoin myös loisen eri genotyyppijä (Rellstab ym. 2013) ja heikosti jopa eri *Diplostomum* -lajeja vastaan (Karvonen ym. 2009). Tutkimuksessani *D. baeri* -loisella immunisoitujen kalojen loismäärä ei eronnut merkittävästi muista immunisaatioryhmistä uudelleenaltistuksessa *D. pseudopathaceum* -loiselle. Tulos on yllättävä ja viittaa siihen, että loislajit voivat vaikuttaa toistensa tartuntamenestykseen ristikkäisresistenssin kautta. Tämä osoittaa, että isännän kohtaamat loislajit ja niiden väliset vuorovaikutukset ovat suurella roolilla syntyvän yhteisörakenteen muodostumisessa (Karvonen ym. 2009, Seppälä ym. 2009).

On epätodennäköistä, että *D. pseudopathaceum* ja *D. baeri* kilpailevat kalassa keskenään resursseista tai elintilasta, koska ne asettuvat silmän eri osiin (Seppälä ym. 2012). Silmä on immunologisesti reagoimatonta aluetta (Sitja-Bobadilla 2008), jolloin kalan immuunivasteilla on aikaa toimia loisia vastaan vain lyhyen vaellusvaiheen aikana. Luultavimmin nämä loislajit vaikuttavat toisiinsa epäsuorasti immuunipuolustuksen kautta (Ezenwa ym. 2010). On kuitenkin epäselvää, missä määrin kirjolohen epäspesifinen ja spesifinen immunitetti vaikuttavat näiden loisten väliseen vuorovaikutukseen (Rauch ym. 2006). Tämän selvittäminen vaatisi immuunivasteiden mittaamista molempia loislajeja vastaan.

5.4. Mitä merkitystä loisten välisillä vuorovaikutuksilla on isännän kannalta?

Loiset voivat vaikuttaa isäntänsä elinkelpoisuuteen eli kasvuun, kuntoon ja lisääntymiseen monin tavoin. Esimerkiksi *D. pseudopathaceum* -infektio vaikuttaa kalaisännän näkökykyyn ja voi siten hidastaa sen kasvua (Karvonen & Seppälä 2008) ja altistaa sen saalistukselle (Seppälä ym. 2004), jolloin loinen vaikuttaa suoraan kalan elinkelpoisuuteen. Kahden loisgenotyypin yhteisinfektio voi nostaa kalan loismäärää

(tämän tutkimuksen kontrollikalat, Karvonen ym. 2012b) ja siten myös korostaa näitä vaikutuksia, joiden voimakkuus on suoraan suhteessa loismäärään (Karvonen ym. 2004a). Haitat voivat täten kasvaa yhteisinfektioitilanteessa. Hankittu immunitetti on isännän kannalta hyödyllinen kahdellakin tapaa, koska se laskee loismääriä sekä poistaa yhteisinfektioista loiselle koituvan hyödyn. Ristikkäisresistenssin kehittäminen johtaa samaan myös muiden loisten tapauksessa. Loiset voivat siis vaikuttaa positiivisesti tai negatiivisesti uusien infektioiden syntyyn (Telfer ym. 2010). Ristikkäisresistenssi voi myös vaikuttaa isäntiin kohdistuviin haittoihin alentamalla isännän loistaakkaa. Isännän laaja-alainen spesifinen immuunivaste voikin olla adaptaatio *Diplostomum*-loisen geneettiselle monimuotoisuudelle (Rellstab ym. 2013). Tätä tukee se, että luonnossa kalat altistuvat usein hyvin suurelle määrälle loisen genotyyppejä (Rauch ym. 2006).

5.5. Työn rajoitteet

Isännän alttiuteen ja immunologisten vasteiden voimakkuuteen vaikuttavat ympäristötekijöiden ohella mm. isännän käyttämä ravinto, kunto, ikä, sosiaalinen asema ja maantieteellinen sijainti (Schmid-Hempel 2011). Kaikki tässä tutkimuksessa käytetyt kalat olivat samanikäisiä ja peräisin samalta viljelylaitokselta, eikä niillä ollut aiempaa kokemusta loisista. Kalojen altistustilanteisiin ja ylläpitoon vaikuttaneet ympäristötekijät olivat jokaisen ryhmän kohdalla kontrolloidut niin, ettei niiden välille syntynyt eroja. Myös kalojen ruokinta toteutettiin kunkin altaan kohdalla samalla tavalla, eivätkä kalojen massat tai pituudet eronneet merkittävästi toisistaan allaskohtaisessa tarkastelussa. Kalat altistettiin uudelleen loisille yksittäisissä astioissa, jolloin mahdollinen sosiaalisen aseman vaikutus loisen tartuntamenestykseen saatiin poistettua.

Kaikki työssä käytetyt isolimakotilot olivat peräisin samasta järvestä, ja niitä käsiteltiin samalla tavoin. Kerkaria-toukkien infektiivisyyteen vaikuttaa altistuslämpötilan lisäksi niiden ikä (Karvonen ym. 2003). Kerkaria-toukkien infektiivisyys alkaa laskea 6 h:n jälkeen, mutta tässä työssä ei käytetty 4 h vanhempia kerkaria-toukkia. Jotkin kotilot tuottivat vähemmän kerkaria-toukkia kuin toiset, mutta kerkariatuotannolla ei ollut vaikutusta toukkien infektiivisyyteen. Kuvatuilla taustamuuttujilla ei siis todennäköisesti ole ollut vaikutusta saatuihin tuloksiin.

5.6. Päätelmät

Loisgenotyyppien väliset vuorovaikutukset muotoutuvat tutkimukseni mukaan monien eri tekijöiden yhdysvaikutuksesta. *Diplostomum pseudospathaceum* -loisen tartuntamenestys riippuu siitä, mitkä genotyypit infektoivat kalan, altistuuko isäntä yhdelle vai useammalle genotyypille yhtä aikaa, missä suhteessa kala niille altistuu ja onko kala kohdannut loisia aiemmin. On todennäköistä, että kalan spesifinen immuunipuolustus on muotoutunut laaja-alaiseksi, jotta se pystyy paremmin käsittelemään useiden eri genotyyppien yhteisinfektioita yhtä aikaa. Loisgenotyyppien väliset vuorovaikutukset voivat myös ylläpitää loisten geneettistä monimuotoisuutta, minkä takia isännänkin on vastattava haasteeseen ylläpitämällä immuunipuolustuksen monimuotoisuutta. Isännän immuunivasteista huolimatta genotyypit todennäköisesti kuitenkin hyötyvät yhteisinfektioista kalassa, koska tällöin niillä on jo geneettisesti erilainen lisääntymiskumppani valmiina pääisäntään siirtyessä. Kaiken kaikkiaan, tulosteni mukaan loisinnan ajallinen ja paikallinen vaihtelu voi vaikuttaa yhden tai useamman loislajin välillä tapahtuvien vuorovaikutusten kautta merkittävästi isäntään muodostuvan loisyhteisön rakenteeseen.

KIITOKSET

Kiitän dos. Anssi Karvosta ja FT Katja-Riikka Louhia tutkielman asiantuntevasta, kannustavasta ja kärsivällisestä ohjauksesta. Taloudellisesta tuesta kiitän Olvi-säätiötä, Kalatalouden ja merenkulun koulutuksen edistämissäätiötä, Raija ja Ossi Tuuliaisien säätiötä sekä kotikuntani Lemminkäinen rahastosäätiötä. Erityiskiitos myös Konneveden tutkimusasemalle rauhallisesta, ravitsevasta ja tehokkaasta työviikosta, jonka aikana tutkielma eteni suurin harppauksin ensimmäiseen kommentointivaiheeseen. Henkisestä tuesta suurin kiitos kuuluu läheisille opiskelutovereilleni, avomiehelleni sekä koiralleni, jotka kaikki pitivät minut jokseenkin järjissäni kirjoitusprosessin aikana ja edesauttoivat merkittävästi työn valmistumista.

KIRJALLISUUS

- Aaltonen T.M., Jokinen E.I. & Valtonen E.T. 1994. Antibody-synthesis in roach (*Rutilus rutilus*): analysis of antibody-secreting cells in lymphoid organs with ELISPOT-assay. *Fish shellfish immunol.* 4: 129–140.
- Afonso A., Lousada S., Silva J., Ellis A.E. & Silva M.T. 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis. Aquat. Org.* 34: 27–37.
- Alcorn S.W., Murray A.L. & Pascho R.J. 2002. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish shellfish immunol.* 12: 303–334.
- Álvarez F., Razquin B., Villena A. & Zapata A. 1998. Seasonal changes in the lymphoid organs of wild brown trout, *Salmo trutta* L.: a morphometrical study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 267–278.
- Alvarez-Pellitero P. 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126: 171–198.
- Amundsen P.A., Knudsen R., Kuris A.M. & Kristoffersen R. 2003. Seasonal and ontogenetic dynamics in trophic transmission of parasites. *Oikos* 102: 285–293.
- van Baalen M. & Sabelis M.W. 1995. The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *Am. Nat.* 146: 881–910.
- Beltran S., Gourbal B., Boissier J., Duval D., Kieffer-Jaquinod S., Pierce A.J., Grunau C., Théron A. & Mitta G. 2011. Vertebrate host protective immunity drives genetic diversity and antigenic polymorphism in *Schistosoma mansoni*. *J. Evol. Biol.* 24: 554–572.
- Bowden T.J. 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish shellfish immunol.* 25: 373–383.
- Carius H.J., Little T.J. & Ebert D. 2001. Genetic variation in a host–parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution* 55: 1136–1145.
- Clark T.G., Dickerson H.W. & Findly R.C. 1988. Immune response of channel catfish to ciliary antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 581–594.
- Collazos M.E., Ortega E., Barriga C. & Rodriguez A.B. 1998. Seasonal variation in haematological parameters in male and female *Tinca tinca*. *Mol. Cell Biochem.* 183: 165–168.
- Cossarini-Dunier M. 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogens: *Yersinia ruckeri* and Egtved virus. *Aquaculture* 49: 197–208.
- Dickerson H.W. & Clark T.G. 1996. Immune response of fish to ciliates. *Annu. Rev. Fish. Dis.* 6: 107–120.

- Dillon R.T. 2000. *The Ecology of Freshwater Molluscs*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ellis A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish shellfish immunol.* 9: 291–308.
- Espelid, S., Løkken G.B., Steiro K. & Bøgwald J. 1996. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Fish shellfish immunol.* 6: 95–110.
- Esteban M.A., Cuesta A., Rodriguez A. & Meseguer J. 2006. Effect of photoperiod on the fish innate immune system: a link between fish pineal gland and the immune system. *J. Pineal Res.* 41: 261–266.
- Ezenwa V.O., Etienne R.S., Luikart G., Beja-Pereira A. & Jolles A.E. 2010. Hidden Consequences of Living in a Wormy World: Nematode-Induced Immune Suppression Facilitates Tuberculosis Invasion in African Buffalo. *Am. Nat.* 176: 613–624.
- Fellowes M.D.E., Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C.J. 1999. Cross-resistance following artificial selection for increased defense against parasitoids in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53: 966–972.
- Frank S.A. 1996. Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.* 71: 37–78.
- Gandon S., Jansen V.A.A. & van Baalen M. 2001. Host life history and the evolution of parasite virulence. *Evolution* 55: 1056–1062.
- Graham A.L. 2008. Ecological rules governing helminth–microparasite coinfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 566–570.
- Graves S.S., Evans D.L. & Dawe D.L. 1985. Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 43–51.
- Haaparanta A., Valtonen E.T. & Hoffman R.W. 1994. Pathogenicity and seasonal occurrence of *Henneguya creplini* (Protozoa, Myxosporea) on the gills of perch *Perca fluviatilis* in central Finland. *Dis. Aquat. Org.* 20: 15–22.
- Harris J. & Bird D.J. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77: 163–176.
- Höglund J. & Thuvander A. 1990. Indications of non-specific protective mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with diplostomosis. *Dis. Aquat. Org.* 8: 91–97.
- Jackson J.A., Pleass R.J., Cable J., Bradley J.E. & Tinsley R.C. 2006. Heterogenous interspecific interactions in a host-parasite system. *Int. J. Parasitol.* 36: 1341–1349.
- Jackson J.A. & Tinsley R.C. 2003. Postlarval *Protopolystoma* spp. kidney infections in incompatible *Xenopus* spp. induce weak resistance to heterospecifics. *Parasitol Res.* 90: 429–434.
- Jokela J., Schmid-Hempel P. & Rigby M. 2000. Dr. Pangloss restrained by the Red Queen – steps towards a unified defence theory. *Oikos* 89: 267–274.
- Jokinen E.I., Aaltonen T.M. & Valtonen E.T. 1995. Subchronic effects of pulp and paper mill effluents on the immunoglobulin synthesis of roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 32: 219–225.
- Jokinen E.I., Salo H.M., Markkula E., Rikalainen A.-K., Arts M.T. & Browman H.I. 2011. Additive effects of enhanced ambient ultraviolet B radiation and increased temperature on immune function, growth and physiological condition of juvenile (parr) Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish shellfish immunol.* 30: 102–108.
- Jokinen E.I. 2012. Kalojen immuunipuolustus - tehokas keino torjua loisia? Teoksessa: Valtonen E.T., Hakalahti-Sirén T., Karvonen A. & Pulkkinen K (toim.), *Suomen kalojen loiset*, Tammerprint oy, Tampere, 375–398.

- Karvonen A., Paukku S., Valtonen E. T. & Hudson P. J. 2003. Transmission, infectivity and survival of *Diplostomum spathaceum* cercariae. *Parasitology* 127: 217–224.
- Karvonen A., Seppälä O. & Valtonen E.T. 2004a. Eye fluke-induced cataract formation in fish: quantitative analysis using an ophthalmological microscope. *Parasitology* 129: 473–478.
- Karvonen A., Seppälä O. & Valtonen E.T. 2004b. Parasite resistance and avoidance behaviour in preventing eye fluke infections in fish. *Parasitology* 129: 159–164.
- Karvonen A., Kirsi S., Hudson P.J. & Valtonen E.T. 2004c. Patterns of cercarial production from *Diplostomum spathaceum*: terminal investment or bet hedging? *Parasitology* 129: 87–92.
- Karvonen A., Paukku S., Seppälä O. & Valtonen E.T. 2005. Resistance against eye-flukes: naïve versus previously infected fish. *Parasitol. Res.* 95: 55–59.
- Karvonen A., Terho P., Seppälä O., Jokela J. & Valtonen E.T. 2006. Ecological divergence of closely related *Diplostomum* (Trematoda) parasites. *Parasitology* 133: 229–235.
- Karvonen A. & Seppälä O. 2008. Effect of eye fluke infection on the growth of whitefish (*Coregonus lavaretus*) – an experimental approach. *Aquaculture* 279: 6–10.
- Karvonen A., Seppälä O. & Valtonen E.T. 2009. Host immunization shapes interspecific associations in trematode parasites. *J. Anim. Ecol.* 78: 945–952.
- Karvonen A., Halonen H. & Seppälä O. 2010. Priming of host resistance to protect cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against eye flukes and parasite-induced cataracts. *J. Fish Biol.* 76: 1508–1515.
- Karvonen A., Taskinen J. & Valtonen E.T. 2012a. Pääjakso laakamadot: luokka imumadot (Trematoda). Teoksessa: Valtonen E.T., Hakalahti-Sirén T., Karvonen A. & Pulkkinen K (toim.), *Suomen kalojen loiset*, Tammerprint oy, Tampere, 111–139.
- Karvonen A., Rellstab C., Louhi K.-R. & Jokela J. 2012b. Synchronous attack is advantageous: mixed genotype infections lead to higher infection success in trematode parasites. *Proc. R. Soc. B.* 279: 171–176.
- Kennedy C.R. 2001. Interspecific interactions between larval digeneans in the eyes of perch, *Perca fluviatilis*. *Parasitology* 122: 13–22.
- Koskivaara M., Valtonen E.T. & Prost M. 1991. Seasonal occurrence of gyrodactylid monogeneans on the roach (*Rutilus rutilus*) and variations between four lakes of differing water quality in Finland. *Aqua Fennica* 21: 47–55.
- Krasnov B.R., Mouillot D., Khokhlova I.S., Shenbrot G.I. & Poulin R. 2005. Covariance in species diversity and facilitation among non-interactive parasite taxa: all against the host. *Parasitology* 131: 557–568.
- Kurtz J. 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26: 186–192.
- Kuukka H., Peuhkuri N. & Kolari I. 2006. *Viljeltyjen lohikalojen kaihi - kartoitus vuonna 2004*. Kala- ja riistaraportteja nro 377. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Helsinki.
- Le Cren E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weights and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J. Anim. Ecol.* 20: 201–219.
- Lemly A.D. & Esch G.W. 1984. Effects of the trematode *Uvulifer ambloplitis* on juvenile bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*: ecological implications. *J. Parasitol.* 70: 475–492.
- Leung T.L.F. & Poulin R. 2007. Interactions between parasites of the cockle *Austrovenus stutchburyi*: hitch-hikers, resident-cleaners, and habitat-facilitators. *Parasitology* 134: 247–255.
- Lewis M.C., Welsford I.G. & Uglem G.L. 1989. Cercarial emergence of *Proterometra macrostoma* and *P. edneyi* (Digenea: Azygiidae): contrasting response to light : dark cycling. *Parasitology* 99: 215–223.

- Lively C.M. 1989. Adaptation by a parasitic trematode to local populations of its snail host. *Evolution* 43: 1663–1671.
- Lively C.M. & Dybdahl M.F. 2000. Parasite adaptation to locally common host genotypes. *Nature* 405: 679–681.
- Lochmiller R.L. & Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88: 87–98.
- Louhi K.-R., Karvonen A., Rellstab C. & Jokela J. 2010. Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? *Infect. Genet. Evol.* 10: 1271–1277.
- Louhi K.-R. 2012. *Evolutionary ecology of complex life cycle parasites - from genotypes to species assemblages*. Väitöskirja. Jyväskylän yliopisto, Bio- ja ympäristötieteiden laitos.
- Louhi K.-R., Karvonen A., Rellstab C., Louhi R. & Jokela J. 2013. Prevalence of infection as a predictor of multiple genotype infection frequency in parasites with multiple-host life cycle. *J. Anim. Ecol.* 82: 191–200.
- Magnadóttir B., Lange S., Gudmundsdóttir S., Bogwald J. & Dalmo R.A. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19: 429–439.
- Marcogliese D.J. 2001. Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environment. *Can. J. Zool.* 79: 1331–1352.
- van Muiswinkel W.B., Wiegertjes G.F. & Stet R.J. 1999. The influence of environmental and genetic factors on the disease of fish. *Aquaculture* 172: 103–110.
- Niewiadomska K. 1986. Verification of the life-cycles of *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) and *D. pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomidae). *Syst. Parasitol.* 8: 23–31.
- Olsen M.M., Kania P.W., Heinecke R.D., Skjoedt K., Rasmussen K.J. & Buchmann K. 2011. Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to *Ichthyophthirius multifiliis* infections: Molecular and immunohistochemical studies. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 859–869.
- Paull S.H., Raffel T.R., La Fonte B.E. & Johnson P.T.J. 2015. How temperature shifts affect parasite production: testing the roles of thermal stress and acclimation. *Functional Ecology* 29: 941–950.
- Pedersen A.B. & Fenton A. 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 22: 133–139.
- Porrozzi R., Teva A., Amaral V.F., Da Costa M.V.S. & Grimaldi G. 2004. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71: 297–305.
- Poulin R. 2000. Variation in the intraspecific relationship between fish length and intensity of parasitic infection: biological and statistical causes. *J. Fish Biol.* 56: 123–137.
- Poulin R. 2001. Interactions between species and the structure of helminth communities. *Parasitology* 122: 3–11.
- Poulin R. 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology* 132: 143–151.
- Poulin R., Steeper M.J. & Miller A.A. 2000. Non-random patterns of host use by the different parasite species exploiting a cockle population. *Parasitology* 121: 289–295.
- Poulin R. & Valtonen E.T. 2002. The predictability of helminth community structure in space: a comparison of fish populations from adjacent lakes. *Int. J. Parasitol.* 32: 1235–1243.
- Price P.W. 1980. *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton University Press, Princeton.

- Pulkkinen K. & Valtonen E.T. 2012. Pääjakso laakamadot: luokka heisimadot (Cestoda). Teoksessa: Valtonen E.T., Hakalahti-Sirén T., Karvonen A. & Pulkkinen K (toim.), *Suomen kalojen loiset*, Tammerprint oy, Tampere, 87–109.
- Rauch G., Kalbe M. & Reusch T.B.H. 2005. How a complex life cycle can improve a parasite's sex life? *J. Evol. Biol.* 18: 1069–1075.
- Rauch G., Kalbe M. & Reusch T.B.H. 2006. One day is enough: rapid and specific host–parasite interactions in a stickleback–trematode system. *Biol. Lett.* 2: 382–384.
- Rauch G., Kalbe M. & Reusch T.B.H. 2008. Partitioning average competition and extreme-genotype effects in genetically diverse infections. *Oikos* 117: 399–405.
- Rellstab C., Karvonen A., Louhi K.-R. & Jokela J. 2013. Genotype-specific vs. cross-reactive host immunity against a macroparasite. *PLoS ONE* 8: e78427.
- Rijkers G.T., Frederix-Wolters E.M.H. & van Muiswinkel W.B. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology* 41: 91–97.
- Rodriguez M.F., Wiens G.D., Purcell M.K. & Palti Y. 2005. Characterization of Toll-like receptor gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* 57: 510–519.
- Roff D.A. 1997. *Evolutionary quantitative genetics*. Chapman & Hall, New York.
- Råberg L., de Roode J.C., Bell A.S., Stamou P., Gray D. & Read A.F. 2006. The role of immune-mediated apparent competition in genetically diverse malaria infections. *Am. Nat.* 168: 41–53.
- Sandland G.J. & Minchella D.J. Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends in Parasitology* 19: 571–574.
- Sitjà-Bobadilla A. 2008. Living off a fish: A trade-off between parasites and the immune system. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 358–372.
- Schmid-Hempel P. 2008. Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends Ecol. Evol.* 23: 318–326.
- Schmid-Hempel P. 2011. *Evolutionary parasitology*. Oxford University Press, Oxford.
- Schmid-Hempel P. & Ebert D. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 27–32.
- Secombes C.J. & Chappell L.H. 1996. Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. *Ann. Rev. Fish Dis.* 6: 167–177.
- Seppälä O., Karvonen A. & Valtonen E.T. 2004. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Animal Behaviour* 68: 257–263.
- Seppälä O., Karvonen A. & Valtonen E.T. 2007. Phenotypic variation in infectivity of *Diplostomum spathaceum* cercariae within a population. *J. Parasitol.* 93: 1244–1246.
- Seppälä O., Karvonen A., Valtonen E.T. & Jokela J. 2009. Interactions among co-infecting parasite species: a mechanism maintaining genetic variation in parasites? *Proc. R. Soc. B.* 276: 691–697.
- Seppälä O., Karvonen A., Rellstab C., Louhi K.-R. & Jokela J. 2012. Reciprocal interaction matrix reveals complex genetic and dose-dependent specificity among coinfecting parasites. *Am. Nat.* 180: 306–315.
- Seppälä O., Louhi K.-R., Karvonen A., Rellstab C. & Jokela J. 2015. Relative reproductive success of co-infecting parasite genotypes under intensified within-host competition. *Infect. Genet. Evol.* 36: 450–455.

- Sheldon B.C. & Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11: 317–321.
- Slater C.H. & Schreck C.B. 1993. Testosterone alters the immune response of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 291–298.
- Slater C.H. & Schreck C.B. 1998. Season and physiological parameters modulate salmonid leucocyte androgen receptor affinity and abundance. *Fish Shellfish Immunol.* 8: 379–391.
- Sorensen R.E. & Minchella D.J. 2001. Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions. *Parasitology* 123: 3–18.
- Studer A. & Poulin R. 2014. Analysis of trait mean and variability versus temperature in trematode cercariae: is there scope for adaptation to global warming? *Int. J. Parasitol.* 44: 403–413.
- Taskinen J., Valtonen E.T. & Gibson D.I. 1991. Studies on bucephalid digeneans parasitising molluscs and fishes in Finland I. Ecological data and experimental studies. *Systematic Parasitology* 19: 81–94.
- Taskinen J., Valtonen E.T. & Mäkelä T. 1994. Quantity of sporocysts and seasonality of two *Rhipidocotyle* species (Digenea: Bucephalidae) in *Anodonta piscinalis* (Mollusca: Bivalvia). *Int. J. Parasitol.* 24: 877–886.
- Taylor L.H., Mackinnon M.J. & Read A.F. 1998. Virulence of mixed-clone and single-clone infections of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution* 52: 583–591.
- Telfer S., Lambin X., Birtles R., Beldomenico P., Burthe S., Paterson S. & Begon M. 2010. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330: 243–246.
- Théron A. & Coustau C. 2005. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J. Helminthol.* 79: 187–191.
- Valtonen E.T. 1980. *Metechinorhynchus salmonis* infection and diet in the river-spawning whitefish of the Bothnian Bay. *J. Fish Biol.* 17: 1–8.
- Valtonen E.T. & Gibson D.I. 1997. Aspects of the biology of diplostomid metacercarial (Digenea) populations occurring in fishes in different localities of northern Finland. *Ann. Zool. Fenn.* 34: 47–59.
- Valtonen E. T., Holmes J. C. & Koskivaara M. 1997. Eutrophication, pollution, and fragmentation: effects on the parasite communities in roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis*) in four lakes in central Finland. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 572–585.
- Valtonen E.T. & Valtonen T. 1980. Metazoan parasites of the sea-spawning whitefish *Coregonus nasus* (Pallas), sensu Svärdson in the Bothnian Bay. *Bothnian Bay Reports* 2: 17–26.
- Valtonen E.T., Karvonen A. & Hakalahti-Sirén T. 2012. Loisten aggregoituminen - Miksi yhdellä kalalla on enemmän loisia kuin toisella? Teoksessa: Valtonen E.T., Hakalahti-Sirén T., Karvonen A. & Pulkkinen K. (toim.), *Suomen kalojen loiset*, Tammerprint oy, Tampere, 305–313.
- Voutilainen A., Valdez H., Karvonen A., Kortet R., Kuukka H., Peuhkuri N, Piironen J. & Taskinen J. 2009. Infectivity of trematode eye flukes in farmed salmonid fish — Effects of parasite and host origins. *Aquaculture* 293: 108–112.
- Waadu G.D.B. & Chappell L.H. 1991. Effect of water temperature on the ability of *Diplostomum spathaceum* miracidia to establish in lymnaeid snails. *J. Helminthol.* 65: 179–185.
- Webster J. & Woolhouse M. 1999. Costs of resistance: relationship between fertility and increased resistance in a snail-schistosome host parasite system. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266: 391–396.

- Whyte S.K, Allan C.J., Secombes C.J. & Chappell L.H. 1987. Cercariae and diplostomules of *Diplostomum spathaceum* (Digenea) elicit an immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *J. Fish Biol.* 31: 185–190.
- Whyte S.K, Chappell L.H & Secombes C.J. 1989. Cytotoxic reactions of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, macrophages for larvae of the eye fluke *Diplostomum spathaceum* (Digenea). *J. Fish Biol.* 35: 333–345.
- Williams M.O. 1966. Studies on the morphology and life-cycle of *Diplostomum* (*Diplostomum*) *gasterostei* (Strigeida: Trematoda). *Parasitology* 56: 693–706.