

Pro gradu -tutkielma

**Kotiloisännän kunnan vaikutus *Diplostomum
spathaceum* -loisen lisääntymiseen**

Katri Liljeroos



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Hydrobiologia ja limnologia

14.2.2007

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Hydrobiologia ja limnologia

LILJEROOS KATRI, S.J.: Kotiloisännän kunnan vaikutus *Diplostomum spathaceum*
-loisen lisääntymiseen

Pro gradu: 23 s.

Työn ohjaajat: Prof. Jukka Jokela, FT Otto Seppälä

Tarkastajat: Prof. E. Tellervo Valtonen, Prof. Jukka Jokela

Joulukuu 2006

Hakusanat: loisen lisääntyminen, isännänkäyttö, ravintomanipulaatio, trade-off, *Diplostomum spathaceum*

TIIVISTELMÄ

Loiset, erityisesti yhdessä muiden ympäristön stressitekijöiden kanssa, voivat olla hyvin haitallisia isännilleen. Ympäristötekijöillä voi kuitenkin olla suora vaikutus myös loisten hyvinvointiin ja lisääntymiseen. Ympäristöstressin vaikutusta *Diplostomum spathaceum* -imumatoloisen (Trematoda) lisääntymiseen tutkittiin kokeellisesti manipuloimalla *Lymnaea stagnalis* -kotiloisännän kuntoa ravintokäsittelyiden avulla. Tutkimuksessa puolet kotiloista ruokittiin *ad libitum* ja puolet oli ilman ruokaa. *Ad libitum* -ruokituissa kotiloissa loisen kerkariatuoanto oli suurempi ja kerkariat olivat parempilaatuisia (elivät pidempään) kuin ilman ruokaa olleissa kotiloissa. Lisäksi kotiloiden kuolleisuus oli suurempi ilman ruokaa olleiden kotiloiden ryhmässä kuin *ad libitum* -ruokituilla. Tuotettujen kerkarioiden laadun ja määrän välillä oli positiivinen riippuvuus molemmissa ravintokäsittelyissä. Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan olettaa, että kotilon syömä energia muuntuu nopeasti kerkariamassaksi ja ulkoisten resurssien määrä vaikuttaa suoraan loisen hyvinvointiin rajoittaen jälkeläistuottoa. Ravintomanipulaatiosta huolimatta tuotettujen kerkarioiden määrän ja laadun välillä ei havaittu trade-offia, vaan loinen pystyi samanaikaisesti panostamaan molempiin ominaisuuksiin. Ympäristöstressin aiheuttama loisen heikentynyt lisääntyminen, sekä isäntien kasvanut kuolleisuus, voivat vaikuttaa jopa loispopulaatioihin, vähentäen linkierrossa seuraavien isäntien altistumista loiselle. Lisäksi loisen lisääntymisen heikkeneminen isännän kunnan laskiessa voi olla osin seurausta loisen plastisesta isännänkäyttöstrategiasta, mikäli loinen vähentää lisääntymistään edistääkseen isäntien selviytymistä stressijaksojen yli.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science
Department of Biological and Environmental Science
Hydrobiology and limnology

LILJEROOS KATRI, S.J.: Effects of host snail condition on reproduction of the parasite
Diplostomum spathaceum

Master of Science Thesis: 23 p.

Supervisors: Prof. Jukka Jokela, PhD Otto Seppälä

Inspectors: Prof. E. Tellervo Valtonen, Prof. Jukka Jokela

December 2006

Key Words: parasite reproduction, host exploitation, food manipulation, trade-off,
Diplostomum spathaceum

ABSTRACT

Parasites, especially with environmental stress, can be very harmful to their hosts. However, environmental factors may also affect directly parasite well being and reproduction. Effect of environmental stress on reproduction of a trematode parasite, *Diplostomum spathaceum*, was studied by manipulating the availability of external resources (food) for its snail hosts, *Lymnaea stagnalis*. In the experiment, snails were divided into “*ad libitum* food supply” and “no food” treatments. Snails that were fed *ad libitum* produced more and higher quality (longer living) cercariae, than snails that were left without food. Furthermore, mortality of snails was higher in the group of food limited individuals. Number of produced cercariae correlated positively with the quality of cercariae in both food treatments. These results suggest that energy eaten by snails changes quickly into parasite biomass, and the amount of external resources can limit parasite reproduction. Acknowledging the effect of food manipulation, trade-off between the number and quality of produced cercariae was not observed, which suggests that the parasite can allocate energy on both properties at the same time. Reduced parasite reproduction and increased host mortality under environmental stress may even affect parasite population dynamics, by reducing exposure of its next hosts to infections. Furthermore host-condition-dependent parasite reproduction can be partly a result of plastic host exploitation strategy by the parasite to enhance host survival over stress periods.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO	5
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	7
2.1. Tutkimussysteemi.....	7
2.2. Koeasetelma	8
2.3. Kerkarioiden eliniän mittaaminen	9
2.4. Tulosten analysointi	9
3. TULOKSET	11
3.1. Ravintomanipulaation vaikutus tuotettujen kerkarioiden määrään ja elinikään .	11
3.2. Ravintomanipulaation vaikutus kotiloiden kuolleisuuteen.....	12
3.3. Tuotettujen kerkarioiden määrän ja laadun välinen riippuvuus	13
4. TULOSTEN TARKASTELU	15
Kiitokset	19
Kirjallisuus	20

1. JOHDANTO

Loinen on eliö, joka saa tarvitsemansa ravinnon isännästä, jossa se elää (esim. Price, 1980). Isäntä ja loinen kilpailevat siten samoista resursseista, minkä takia loisilla on yleensä negatiivinen vaikutus isäntiinsä (virulenssi; Hamilton, 1980; Poulin, 1998). Loiset voivat mm. lyhentää isäntiensä elinikää, hidastaa kasvua ja alentaa hedelmällisyyttä (mm. Jaenike & Benway, 1995; Polak, 1996; Perlman & Jaenike, 2003; Bedhomme ym., 2004; Tseng, 2004; Field & Michiels, 2005). Suorien vaikutusten lisäksi loiset voivat aiheuttaa myös epäsuoria haittoja, kuten lisätä isäntien riskiä joutua petojen saaliiksi (esim. Hudson ym., 1992; Vance & Peckarsky, 1997; Seppälä ym., 2004, 2005). Aina loisten ei kuitenkaan ole havaittu vaikuttavan negatiivisesti isäntiinsä (esim. Eisen, 2001; Brown ym., 2003) ja osalla loisista on jopa positiivinen vaikutus joihinkin isäntien ominaisuuksiin (esim. selviytyminen/elinikä; Telfer ym., 2002; Hurd ym., 2001).

Erityisesti yhdessä muiden ympäristön stressitekijöiden kanssa loiset voivat aiheuttaa suurta haittaa isännilleen. Tämä on havaittu useissa tutkimuksissa, joissa on manipuloitu erilaisia ympäristöolosuhteita. Esimerkiksi aliravitsemuksen (Jokela ym., 1999; Brown ym., 2000; Krist ym., 2004; Jokela ym., 2005), matalan happipitoisuuden (Sousa & Gleason, 1989; Jokela ym., 2005), matalan lämpötilan (Lemly & Esch, 1984) ja saasteiden (Lafferty & Kuris, 1999; McDowell ym., 1999) on havaittu lisäävän erityisesti loisittujen yksilöiden kuolleisuutta. Ympäristön stressitekijöiden lisäksi myös isännän fysiologiset tekijät, kuten sukupuoli, voivat vaikuttaa loisten isännälleen aiheuttamiin haittoihin (Webberley & Hurst, 2002; Bize ym., 2005).

Ympäristön stressitekijöillä voi kuitenkin olla suora vaikutus myös loisiin. Yleisesti loisten on arvioitu voivan paremmin huonokuntoisissa isännissä niiden heikentyneen immuunipuolustuksen takia (Dobson & Bawden, 1974; Slater & Keymer, 1986). Esimerkiksi Krasnovin ym. (2005) tekemässä tutkimuksessa havaittiin, että *ad libitum* (ruokaa rajattomasti) ruokituissa *Merione crassus* -jyrsijöissä elävät *Xenopsylla ramesis* -kirput tuottivat vähemmän munia ja munien kuoriutumisprosentti oli alhaisempi kuin aliravituissa isännissä elävillä yksilöillä. Myös edellisen hypoteesin vastaisia havaintoja on tehty, sillä muutamissa tutkimussysteemeissä loisten lisääntymisen on havaittu heikentyneen huonoissa elinolosuhteissa. Esimerkiksi Bedhommen ym. (2004) tekemässä tutkimuksessa havaittiin, että isännän ravinnon saatavuus vaikutti *Aedes aegypti* -sääskessä

elävien *Vavraia culicis* -loisten lisääntymiseen siten, että loiset, jotka elivät vähän ruokaa saaneissa isännissä, tuottivat myös vähän itiöitä.

Teoria virulenssin evoluutiosta ennustaa, että valinta suosii loisgenotyyppettä, jotka käyttävät isäntäänsä tehokkaammin (virulenssi kasvaa), kun isäntien kuolleisuus muihin syihin lisääntyy. Tällainen syy voi olla esimerkiksi lisääntynyt riski joutua saalistuksen kohteeksi. On kuitenkin myös tutkimuksia jotka näyttävät, että isännänkäyttöteho voi pienentyä (Ebert & Herre, 1996; Williams & Day, 2001; Choo ym., 2003). Optimaalinen isännänkäyttöstrategia voi myös riippua isännän fenotyypistä. Tämän seurauksena loisille voi kehittyä erilaisia strategioita käyttää isäntiään niiden fenotyypistä riippuen (Pfennig, 2001). Jos loinen käyttää isäntäänsä varovaisesti ottamalla ravinteita aiheuttamatta suuria vahinkoja isännälle, loinen saa isännästä pitkään kestävää hyötyä, sillä isäntä pysyy tällöin pidempään elossa. Loiset voivat käyttää isäntäänsä myös ottamalla resursseja nopeasti, jolloin virulenssi on suurempi, eikä loisten saama hyöty ole yhtä pitkäkestoista (Frank, 1996). Onkin esitetty, että loiset voivat käyttää isäntiään mukautuvasti ympäristöolosuhteiden, kuten saatavilla olevien resurssien suhteen, jolloin loiset voisivat vastata ympäristön vaihteluun muuttamalla isännänkäyttötehoaan (fenotyypin plastisuus; Pfennig, 2001; Jokela ym., 2005). Tämä mahdollistaisi tehokkaan isännänkäytön hyvien ympäristöolosuhteiden vallitessa, mutta ei vaarantaisi isäntien elossasäilymistä olosuhteiden heiketessä, mahdollistaen siten pitkäkestoisen infektion.

Eliöt joutuvat jakamaan käytössä olevat resurssinsa eri toimintojen kesken. Trade-off eli allokaatiokustannus on seurausta kilpailusta samoista sisäisistä resursseista (Zera & Harshman, 2001). Tällöin yksilöt joutuvat allokoimaan rajallisia resurssejaan eri toimintojen välillä siten, että toimintojen välille syntyy negatiivinen riippuvuus (van Noordewijk & de Jong, 1986). Useissa tutkimuksissa vapaana elävien eliöiden jälkeläisten määrän ja laadun välillä on osoitettu olevan trade-off (mm. Kaufman & Kaufman, 1987; Smith ym., 1989; Sinervo & Licht, 1991; Christians, 2000). Loisilla kyseistä ilmiötä on tutkittu vain harvoissa tutkimussysteemeissä, eikä vastaavaa ole havaittu (Rossin ym., 2005; Timi ym., 2005). Esimerkiksi kaloja loisivalla *Lernanthoropus cynoscicola* -hankajalkaisella ei Timin ym. (2005) tekemässä tutkimuksessa havaittu negatiivista riippuvuutta tuotettujen munien koon ja määrän välillä. Tämä osoittaa, että *L. cynoscicola* -hankajalkainen pystyy samanaikaisesti panostamaan sekä munien kokoon että määrään. Onkin yleistä, että ominaisuuksien välillä oletetaan olevan trade-off, vaikka

todellisuudessa ominaisuudet korreloivat positiivisesti (Charlesworth 1990; Mole & Zera, 1993). Jotta eri ominaisuuksien välillä oleva trade-off näkyisi, tulisi tutkittavilla yksilöillä olla samanlaiset rajalliset resurssit käytössään (van Noordewijk & de Jong, 1986; Brown, 2003). Hyvissä olosuhteissa ominaisuuksien välinen negatiivinen riippuvuus ei välttämättä näy, sillä tällöin yksilöt pystyvät panostamaan kaikkiin ominaisuuksiin (Haukioja & Hakala, 1978). Onkin esitetty, että loisilla ei ole trade-offia jälkeläisten määrän ja laadun välillä, juuri siksi että isännät tarjoavat niille lähes rajattoman resurssien lähteen (Rossin ym., 2005; Timi ym., 2005).

Tämän pro gradu -työn tarkoituksena on selvittää miten isolimakotilon (*Lymnaea stagnalis*) kunto vaikuttaa *Diplostomum spathaceum* -imumatoloisen lisääntymiseen. Työssä tarkastelen kotilon kunnan (ravintomanipulaatio) vaikutusta loisen lisääntymiskapasiteettiin (tuotettujen kerkarioiden määrään), jälkeläisten laatuun (kerkarioiden elinikään), kotiloiden kuolleisuuteen sekä tuotettujen kerkarioiden määrän ja laadun väliseen riippuvuuteen (trade-off). Isännän kunnan vaikutusta loisten lisääntymiseen on tutkittu aiemmin vain harvoin käyttäen selkärangattomia isäntiä. Lisäksi trade-offia loisten määrän ja laadun välillä ei ole aikaisemmin tutkittu manipuloimalla tarjolla olevien resurssien määrää.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Tutkimussysteemi

Diplostomum spathaceum -imumatoloinen käyttää elinkierrossaan kolmea eri isäntää. Loinen aikuistuu lakkien (Laridae) ja muiden kalaa syövien lintujen suolessa (Chappel ym., 1994). Loisen munat kulkeutuvat lintujen ulosteiden mukana veteen ja kuoriutuvat suotuisissa olosuhteissa mirakidiatoukiksi. Mirikidiat tunkeutuvat loisen ensimmäisiin väliisäntiin eli Lymnaeidae -heimon kotiloihin. Kotilossa loinen lisääntyy suvuttomasti muodostaen sporokystejä ja edelleen kerkariatoukkia. Kerkarioiden tuotto on lämpötilariippuvaista ja yksittäinen loisittu kotilo voi tuottaa tuhansia kerkarioita päivässä (Lyholt & Buchmann, 1996; Karvonen ym., 2004). Tämä *D. spathaceum* -loisen intensiivinen isännänkäyttö aiheuttaa kotilon kastration ja lisää niiden kuolleisuutta (Chappel ym., 1994; Karvonen ym., 2004). Kerkariatoukat tunkeutuvat kaloihin ihon ja kidusten läpi ja kulkeutuvat silmien linsseihin kehittyen metakerkariatoukiksi. Kala väli-

isännäksi sopivat useat eri kalalajit (Valtonen & Gibson, 1997). Takaisin pääisäntään loinen pääsee, kun lintu syö loisitun kalan (Chappel ym., 1994).

Tutkimuksen kokeellinen osuus tehtiin Jyväskylän yliopiston Konneveden tutkimusasemalla heinä-elokuussa 2004. Koetta varten kerättiin *Lymnaea stagnalis* -kotiloita 8.7.2004 Ylikiimingin Huuonjärvestä (65°06'N, 26°08'E). *Diplostomum spathaceum* -imudadolla loisitut kotilot erotettiin muilla lajeilla infektioituneista kotiloista niiden tuottamien kerkarioiden lepoasennon perusteella. Tällöin kerkarioiden häntä on taittunut 90°:n kulmaan ja furcat ovat 180°:n kulmassa toisiinsa nähden (Niewiadomska, 1986). Kerkarioiden lajintunnistus tehtiin preparointimikroskooppia apuna käyttäen. Kotilot, joista löydettiin *D. spathaceum* -infektio, siirrettiin kylmiöön odottamaan kokeen aloittamista. Tutkimuksessa käytettiin täysikasvuisia kotiloita (39-49 mm), joissa infektio oli täysin kehittynyt (kotiloiden sukeraukset täynnä loisen sporokystejä) ja siten kotiloiden tuottamien *D. spathaceum* -kerkarioiden määrä ja elinikä olivat samansuuruiset kuin aikaisemmissa tutkimuksissa (Karvonen ym., 2003; Karvonen ym., 2004). *Diplostomum spathaceum* -loisen sporokystit kasvavat ja kehittyvät infektion vanhetessa, joten infektion alkuvaiheessa kerkarioita ei tuoteta yhtä paljon kuin infektion myöhemmissä vaiheissa (Chappel ym., 1994). Tutkimuksessa ei ollut mahdollista käyttää loisettomia kotiloita, koska kaikki Huuonjärvestä kerätyt kotilot olivat infektioituneet jollakin loislajilla. Tämän takia loisen aiheuttaman kuolleisuuden riippuvuutta isännän kunnosta ei voitu arvioida.

2.2. Koeasetelma

Ennen ravintomanipulaatiokokeen aloittamista kotiloita ruokittiin seitsemän päivän ajan (21.–28.7.2004) tuoreella salaattilla *ad libitum*, jotta kotiloiden kunto olisi maksimaalinen ennen kokeen aloittamista. Kotilot pidettiin yksittäin muovisissa pakasterasioissa (0,7 litraa vettä; 20°C). Astioiden vedet vaihdettiin päivittäin. Kotilot säilytettiin koko tutkimuksen ajan huoneessa ikkunan vieressä, joten kotiloilla oli kokeen ajan luonnollinen valorytmi.

Ravintomanipulaatiokokeeseen valittiin 40 *Lymnaea stagnalis* -kotioloa, jotka söivät hyvin salaattia ja tuottivat kerkarioita riittävästi kerkarioiden elinikämittauksia varten (katso alla). Ravintomanipulaatiokoe alkoi 29.7.2004. Kokeen ensimmäisellä viikolla (29.7.–4.8.2004) kullekin kotilolle annettiin 3 grammaa tuoretta salaattia päivässä. Tämän oli edellisellä

viikolla havaittu olevan riittävästi *ad libitum* ruokinnalle. Kokeen aikana kotilot vaihdettiin uuteen astiaan (0,7 litraa vettä) aamuisin kello 9.00, tarkastettiin olivatko kotilot elossa ja poistettiin edellisen päivän salaattiannoksesta ylijäänyt osuus sekä annettiin päivän salaattiannos. Kotiloiden *D. spathaceum* -kerkarioiden edellisen vuorokauden tuotanto laskettiin heti tämän jälkeen astioista, joissa kotilot olivat olleet, ottamalla 5 kappaletta 1 ml:n vesinäytteitä jokaisesta astiasta. Astioiden laskentajärjestys satunnaistettiin ja vain elävät kerkariat laskettiin. Kotiloiden syömättä jättämä salaatti punnittiin.

Ensimmäisen viikon jälkeen (5.8.2004) kotilot jaettiin kahteen ryhmään. Tällöin kotiloista oli elossa 33 yksilöä. Toinen ryhmä (16 kotiloa) jatkoi *ad libitum* -ruokinnalla ja toinen ryhmä (17 kotiloa) jätettiin ilman ruokaa. Vesien vaihtaminen ja kerkariatuotannon laskeminen tehtiin kuten ensimmäisellä viikolla, paitsi kerkarioiden elinikämittausten (3 kpl) ensimmäisenä päivänä, jolloin aamuisen vedenvaihdon yhteydessä kotiloille annettiin vain 0,5 litraa vettä ja loput 0,2 litraa lisättiin vasta kun kerkariat oli poimittu elinikämittausta varten (katso alla).

2.3. Kerkarioiden eliniän mittaaminen

Kotiloiden tuottamien *D. spathaceum* -kerkarioiden laatua mitattiin niiden eliniällä. Elinikä kertoo kerkarioiden laadun yhtä hyvin kuin infektiivisyys, sillä se laskee juuri ennen kerkarioiden kuolemaa (Karvonen ym., 2003). Elinikämittaukset tehtiin kokeen aikana viikon välein (5.-7.8., 12.-14.8. ja 19.-21.8.2004). Ensimmäisellä mittauskerralla mukana oli 33, toisella 29 ja kolmannella 18 kotiloa, eli kaikki kotilot, jotka olivat eläneet kyseiseen mittauskertaan. Elinikämittauksiin tarvittavien kerkarioiden keräämiseksi kotilot laitettiin yksittäin lasipurkkeihin 0,2 litraan vettä kello 13–14 väliseksi ajaksi. Tämän jälkeen jokaiselta kotilolta poimittiin 20 kerkariaa kuoppalevyille siten, että kukin kerkaria laitettiin omaan kuoppaansa 200 µl:aan vettä. Kerkarioiden elossasäilymistä seurattiin neljän tunnin välein niin kauan kun kerkarioita oli elossa. Jokaisella kerralla kuoppalevyt tarkastettiin satunnaisessa järjestyksessä.

2.4. Tulosten analysointi

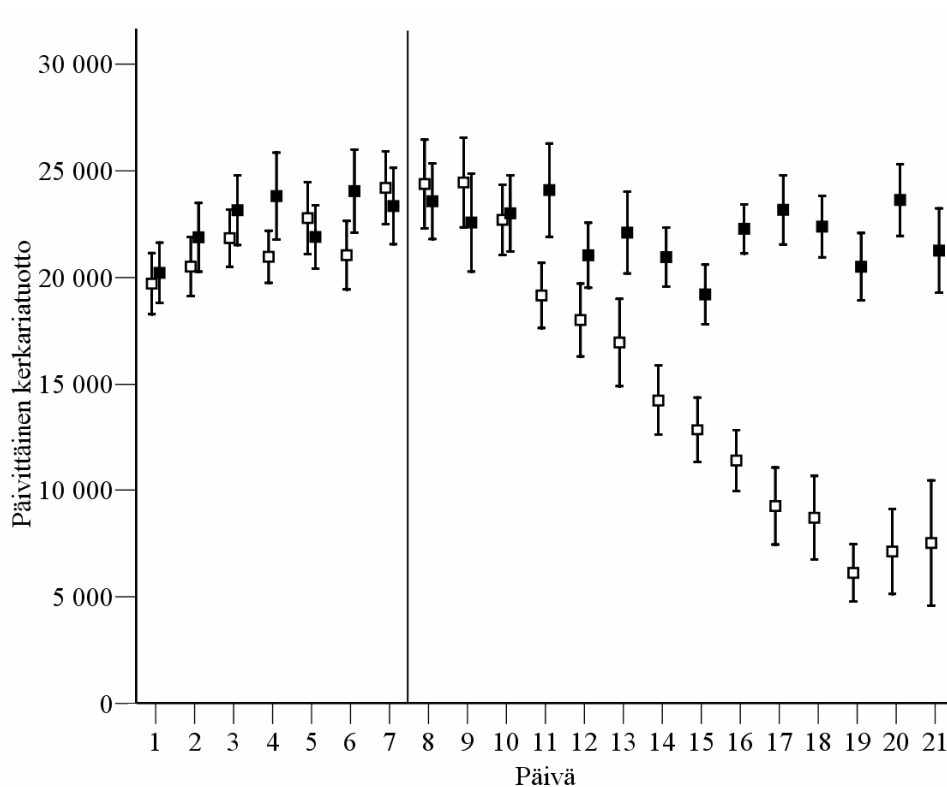
Ravintomanipulaation vaikutusta tuotettujen kerkarioiden määrään testattiin toistomittaus ANOVA:lla käyttäen kotilokohtaisia kerkarioiden päivätuotantoja havaintoyksikköinä. Ensimmäinen viikko, jolloin kaikki kotilot saivat ruokaa, testattiin erikseen, jotta

varmistettiin, etteivät eri ravintokäsittelyihin joutuneet kotilot eronneet ennen käsittelyn alkamista. Sama analyysi tehtiin myös ravintomanipulaation alettua (viikoille 2 ja 3). Myös ravintomanipulaation vaikutusta kerkarioiden keskimääräiseen elinikään analysoitiin toistomittaus ANOVA:lla (viikot 2 ja 3). Ensimmäinen viikko, jolloin kaikki kotilot saivat ruokaa, testattiin erikseen käyttäen riippumattomien otosten t-testiä. Testeissä käytettiin kotiloita, jotka olivat selvinneet kunkin jakson loppuun. Yksi *ad libitum* -ruokinnalla ollut kotilo poistettiin kaikista analyyseistä koska se lopetti kokeen aikana syömisen kokonaan. Kotiloiden kuolleisuutta testattiin cox-regressiolla käyttäen kotiloiden syömän salaatin määrää (päivittäinen keskiarvo) ja kotiloiden tuottamien kerkarioiden määrän päivittäistä keskiarvoa selittävinä muuttujina. Paras selittävä malli haettiin ”forward” menetelmällä. Tuotettujen kerkarioiden määrän ja laadun välinen trade-off tarkastelu tehtiin kokeen toisen viikon jälkeen, jolloin ravintomanipulaatio oli ollut käynnissä viikon ajan. Tarkastelu tehtiin ravintomanipulaation aikana, koska trade-off tilanne tulee paremmin näkyviin kun yksilöillä on samat resurssit käytössä. Toisella viikolla oli myös analyysia varten enemmän kotiloita elossa kuin kolmannella viikolla. Tarkastelu tehtiin erikseen *ad libitum* ja ilman ruokaa olleiden kotiloiden ryhmille. On oletettavaa, että kotilon koko ja sen käyttämän ravinnon määrä vaikuttavat kotilon tuottamien kerkarioiden määrään ja laatuun, minkä takia analyyseissä testattiin ensin riippuuko tuotettujen kerkarioiden määrä ja elinikä kotiloiden koosta ja syödyn salaatin määrästä käyttäen Pearsonin korrelaatiota. Kotilon koon ja syödyn ruoan määrän vaikutus poistettiin laskemalla standardoidut residuaalit muuttujien välisestä regressiosta. Muuttujien välinen riippuvuus analysoitiin residuaaleista käyttäen Pearsonin korrelaatiota. Tilastollinen testaus tehtiin käyttäen SPSS 12.0.1 for Windows -ohjelmistoa (SPSS Inc.).

3. TULOKSET

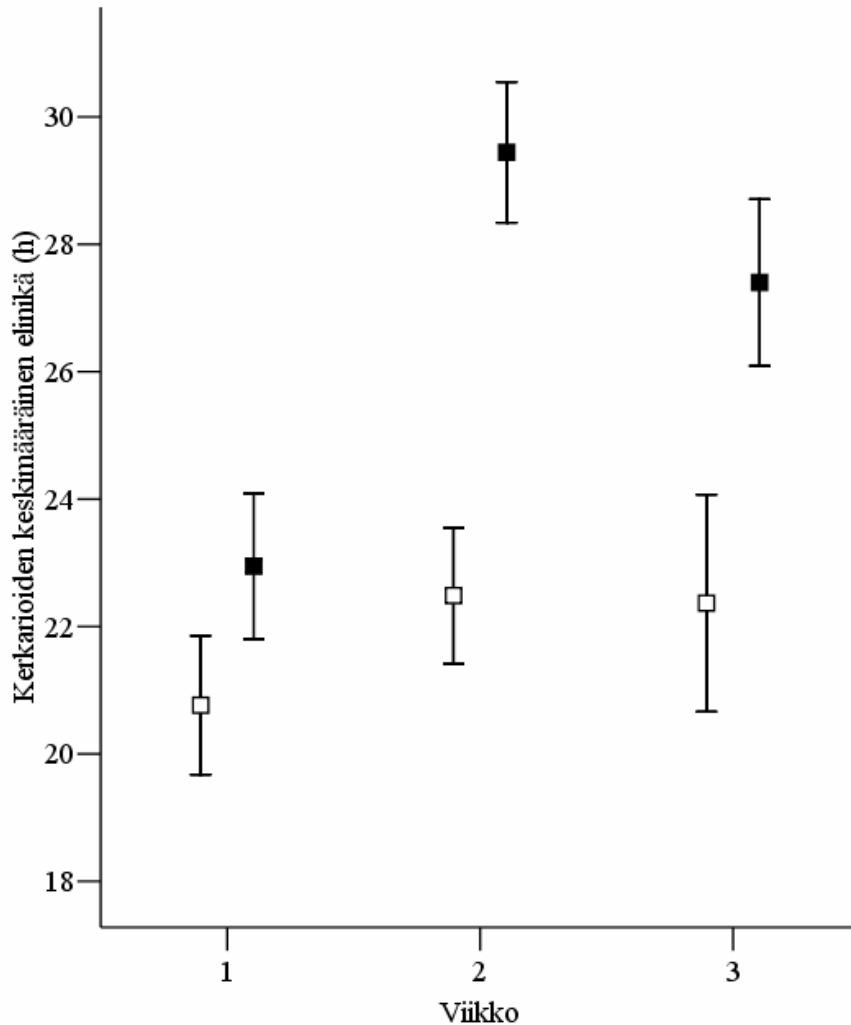
3.1. Ravintomanipulaation vaikutus tuotettujen kerkarioiden määrään ja elinikään

Ennen ravintomanipulaation aloittamista (viikko 1), ryhmien välillä ei ollut eroa tuotettujen kerkarioiden määrässä (toistomittaus ANOVA: $F_{1,30}=0,288$, $p=0,595$; Kuva 1). Ravintomanipulaation alettua (viikot 2 ja 3), tuotettujen kerkarioiden määrä laski ilman ruokaa olleilla kotiloilla (toistomittaus ANOVA: $F_{1,16}=6,046$, $p=0,026$; Kuva 1).



Kuva 1. *Ad libitum* ruokittujen (■) ja ilman ruokaa olleiden (□) kotiloiden keskimääräinen päivittäinen *D. spathaceum* -kerkarioiden tuotto (\pm SE) koko kokeen ajalta. Mukana kaikki kyseisenä päivänä elossa olleet kotilot. Ravintomanipulaatio alkoi kokeen seitsemännen vuorokauden jälkeen.

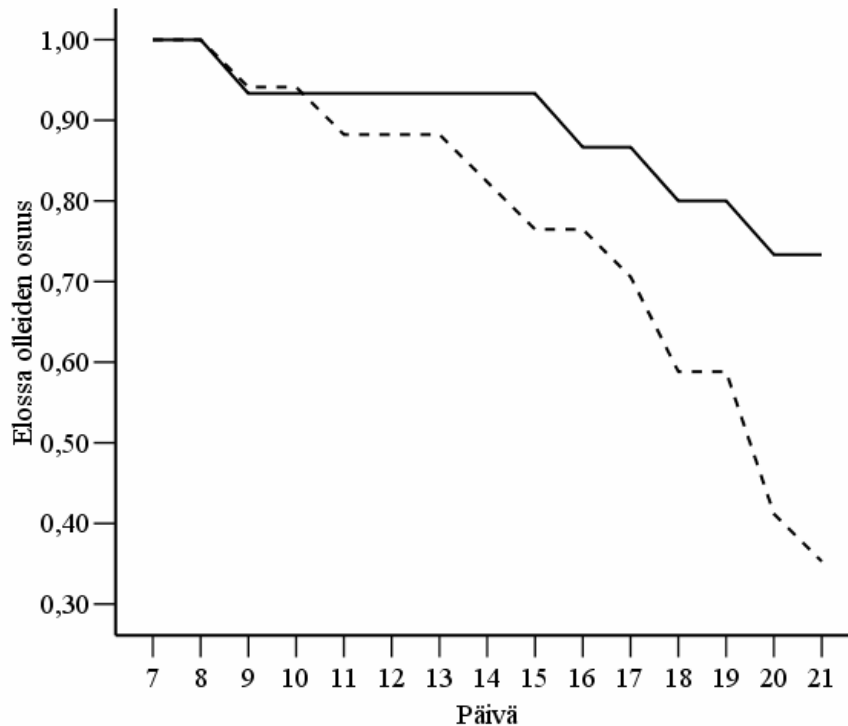
Ennen ravintomanipulaation aloittamista (viikko 1) ryhmien välillä ei ollut eroa kerkarioiden eliniässä (riippumattomien otosten t-testi: $t_{30}= -1,382$, $p=0,177$; Kuva 2). Ravintomanipulaation alettua (viikot 2 ja 3) ilman ruokaa olevien kotiloiden tuottamat kerkariat elivät lyhyemmän aikaa kuin *ad libitum* -ruokinnalla olleiden (toistomittaus ANOVA: $F_{1,15}=8,579$, $p=0,010$; Kuva 2).



Kuva 2. *Ad libitum* ruokittujen (■) ja ilman ruokaa (□) olleiden koteloiden tuottamien *D. spathaceum* -kerkarioiden keskimääräinen elinikä tunteina (\pm SE) kolmella elinikämittauskerralla (viikon 1, 2 ja 3 jälkeen). Ensimmäisellä viikolla kaikki kotelot saivat ruokaa.

3.2. Ravintomanipulaation vaikutus koteloiden kuolleisuuteen

Ravintomanipulaation aikana ilman ruokaa olleiden koteloiden kuolleisuus oli suurempaa kuin *ad libitum* ruokituilla kotelilla (cox-regressio: Wald=3,945, df=1, p=0,047; Kuva 3). Selittävänä muuttujana käytettiin koteloiden syömän salaatin määrää. Analyysissä kerkarioiden keskimääräisen päivätuoton vaikutus ei ollut merkitsevä (df=1, p=0,911), joten se jäi lopullisen mallin ulkopuolelle.

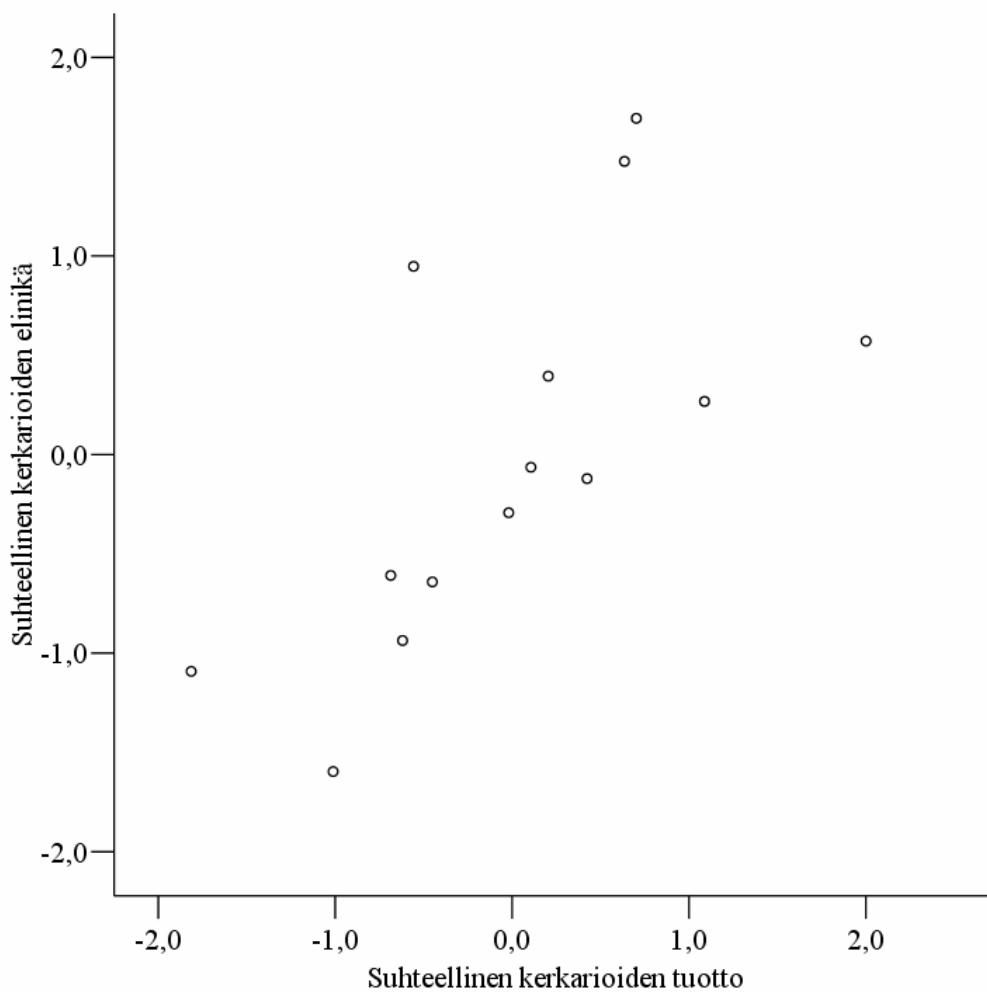


Kuva 3. Ravintomanipulaation vaikutus *D. spathaceum* -loisella infektoiduneiden kotiloiden kuolleisuuteen. *Ad libitum* -ruokinnalla olleiden kotiloiden kuolleisuus on merkitty kuvaan yhtenäisellä viivalla ja ilman ruokaa olleiden katkoviivalla. Kuvassa päivä 7 on ravintokäsittelyiden aloittamispäivä.

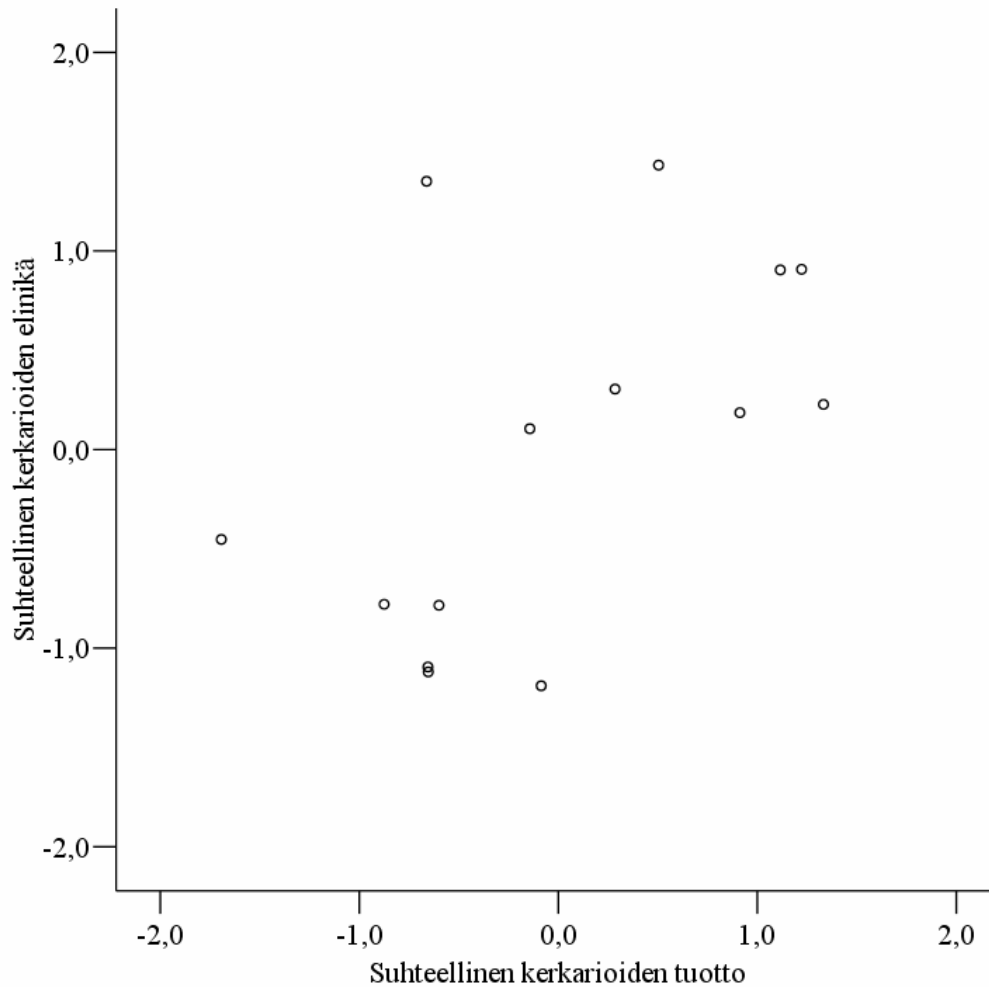
3.3. Tuotettujen kerkarioiden määrän ja laadun välinen riippuvuus

Trade-off tarkastelu kotiloiden tuottamien kerkarioiden määrän ja laadun (eliniän) välillä tehtiin kokeen toisen viikon jälkeen, jolloin ravintomanipulaatio oli ollut käynnissä viikon ajan. Tarkastelu tehtiin erikseen *ad libitum* ruokituille ja ilman ruokaa olleille kotiloille, kotilon kunnan vaikutuksen selvittämiseksi. *Ad libitum* -ruokinnalla olleiden ryhmässä kotilon koko ei korreloinut tuotettujen kerkarioiden määrän (Pearsonin korrelaatio: $r=-0,122$, $N=14$, $p=0,677$) eikä kerkarioiden eliniän (Pearsonin korrelaatio: $r=-0,187$, $N=14$, $p=0,523$) kanssa. Syödyn ruoan määrän ja kerkarioiden tuoton välillä ei myöskään ollut korrelaatiota (Pearsonin korrelaatio: $r=-0,016$, $N=14$, $p=0,957$). Syödyn ruoan määrän ja kerkarioiden eliniän välillä oli puolestaan korrelaatio (Pearsonin korrelaatio: $r=-0,635$, $N=14$, $p=0,015$). Tämä korrelaatio voi johtua siitä, että kotilot, jotka tuottivat hyvälaatuisia kerkarioita, söivät vähemmän, koska olivat joko hyvässä kunnossa tai puolestaan kuolemaisillaan, jolloin ravinnon käyttö oli vähäistä. Ilman ruokaa olleiden ryhmässä kotilon koko ei korreloinut tuotettujen kerkarioiden määrän (Pearsonin korrelaatio: $r=0,345$, $N=14$, $p=0,227$) eikä eliniän (Pearsonin korrelaatio: $r=0,429$, $N=14$, $p=0,125$) kanssa. Vaikka korrelaatiot kotilon koon ja tuotettujen kerkarioiden määrän ja

eliniän välillä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, niiden vaikutus poistettiin kerkarioiden määrä-laatu trade-off tarkastelusta, koska ilman ruokaa olleiden ryhmässä korrelaatio kotilon koon ja kerkarioiden eliniän välillä oli suuntaa antava ($p=0,125$). *Ad libitum* ruokittujen kotiloiden syömän salaatin (viikon keskiarvo) määrän vaikutus poistettiin, sillä syödyn ruoan määrän ja kerkarioiden eliniän välillä oli korrelaatio ($p=0,015$). Kummassakaan ravintokäsittelyryhmässä kotiloiden tuottamien kerkarioiden määrän ja laadun välillä ei havaittu trade-offia, sillä muuttujien väliset korrelaatiot olivat merkitsevästi positiivisia (*ad libitum*: Pearsonin korrelaatio: $r=0,542$, $N=14$, $p=0,045$; Kuva 4; ei ruokaa: Pearsonin korrelaatio: $r=0,662$, $N=14$, $p=0,010$; Kuva 5).



Kuva 4. *Ad libitum* -ruokinnalla olleiden kotiloiden tuottamien kerkarioiden suhteellisen määrän ja laadun välinen riippuvuus. Molempien muuttujien aineisto koostuu kotilon kokoa ja käytetyn ravinnon määrää vastaan tehdystä lineaarisesta regressiosta ja siitä lasketuista standardoiduista residuaaleista.



Kuva 5. Ilman ruokaa olleiden kotiloiden tuottamien kerkarioiden suhteellisen määrän ja laadun välinen riippuvuus. Molempien muuttujien aineisto koostuu kotilon kokoa vastaan tehdystä lineaarisesta regressiosta ja siitä lasketuista standardoiduista residuaaleista.

4. TULOSTEN TARKASTELU

Yleisen oletuksen mukaan loiset voivat paremmin huonokuntoisissa isännissä, niiden heikentyneen immuunipuolustuksen takia (Dobson & Bawden, 1974; Slater & Keymer, 1986; Siva-Jotky & Thompson, 2002). Tutkimukseni tulokset ovat kuitenkin ristiriidassa tämän oletuksen kanssa, sillä tutkimuksessa havaitsin, että *ad libitum* -ruokinnalla olleissa *Lymnaea stagnalis* -kotiloissa *Diplostomum spathaceum* -imumatolaiset tuottivat enemmän ja parempilaatuisia kerkarioita kuin ilman ruokaa olleissa kotiloissa. Ravintomanipulaation alettua kerkariatuotanto laski tasaisesti ilman ruokaa olleissa kotiloissa, mutta pysyi tasaisena ruokituissa yksilöissä. Lisäksi ravintomanipulaation vaikutus näkyi kerkarioiden eliniässä siten, että ilman ruokaa olleista kotiloista vapautuneiden kerkarioiden elinikä pysyi koko tutkimuksen ajan samana, mutta *ad libitum*

-ruokinnalla olleista kotiloista vapautuneiden kerkarioiden elinikä nousi ensimmäisen ja toisen elinikämittauksen välillä. Jälkimmäinen tulos voi johtua siitä, että viikon mittainen *ad libitum* -ruokinta ennen kokeen aloittamista ei välttämättä ollut riittävän pitkä kotiloiden kunnan nostamiseksi kylmiössä olon jälkeen ja tämän takia kerkariat eivät vielä ensimmäisellä elinikämittauksella olleet niin hyvälaatuisia. Toinen selitys voi olla se, että infektion vanhetessa loinen tuottaa parempilaatuisia kerkarioita. Molemmissa tapauksissa ravinnon poisto on voinut estää kerkarioiden eliniän kasvun kokeen aikana. Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan arvela, että kotilon syövä energia muuntuu melko nopeasti kerkariamassaksi, sillä kerkariatuotanto alkoi vähentyä heti ravinnon poistamisen jälkeen. Ulkoisten resurssien määrä ei siis välttämättä rajoita isännän kykyä vastustaa loista, joka on jo menestyksekkäästi tunkeutunut isäntään ja aiheuttanut kroonisen infektion. Ulkoisten resurssien määrä voi sen sijaan vaikuttaa suoraan lisääntyvien loisten hyvinvointiin rajoittaen niiden jälkeläistuottoa.

Isännän kunnan vaikutusta loisiin on tutkittu aikaisemmin pääsääntöisesti käyttäen isäntinä selkärangattomia eliöitä. Tämän tutkimuksen lisäksi selkärangattomia isäntiä on käytetty vain harvoin (Keas & Esch 1997; Ebert ym. 2000, 2004; Sandland & Minchella 2003; Bedhomme ym. 2004). Myös näissä tutkimuksissa loisten lisääntymisen on havaittu vähentyvän isännän kunnan heiketessä. Esimerkiksi Ebert ym. (2000, 2004) ovat tutkimuksissaan havainneet, että *Daphnia magna* -vesikirppua loisivat *Pasteuria ramosa* -bakteerit tuottavat enemmän itiöitä paljon ruokaa saaneissa isännissä kuin vähän ruokaa saaneissa isännissä. Myös *Aedes aegypti* -sääskeä loisiva *Vavraia culicis* -mikrosporidiloinen tuottaa enemmän itiöitä infektoituaan hyvin ruokitun isännän kuin huonosti ruokitun (Bedhomme ym., 2004). Myös isännän käyttämän ravinnon laadun on raportoitu vaikuttavan loisten lisääntymiseen. Sandland & Minchella (2003) ovat havainneet, että runsaasti proteiinia sisältävää ravintoa saaneissa *Lymnaea elodes* -kotiloissa loisineet *Echinostoma revolum* -loiset tuottivat enemmän kerkarioita kuin vähän proteiinia sisältävää ravintoa saaneissa kotiloissa loisineet. Tämän ja aiempien tutkimusten pohjalta voidaan siten arvioida, että isännän kunnan vaikutus loisiin riippuu voimakkaasti lois-isäntä suhteiden välisistä eroista selkärangkaisten ja selkärangattomien isäntien välillä. Tämä voi johtua isäntien ja loisten biomassojen suhteesta ja siten isännänkäyttötehon suurista eroista eri tutkimussysteemien välillä (Pulkkinen & Ebert, 2004). Selkärangaisilla isännillä ja niiden loisilla on suuri kokoero, kun taas selkärangattomien eliöiden loiset ovat

pääsääntöisesti suurempia suhteessa isännän kokoon. Tämän takia selkärangattomissa isännissä loiset tyypillisesti käyttävät suuremman osan isännän resursseista kuin selkärankaisilla ja siten isännän kunnan heikentymisellä voidaan olettaa olevan suurempi negatiivinen vaikutus myös loisiin.

Tässä tutkimuksessa vähentyneen kerkariatuotannon sekä heikentyneen kerkarioiden laadun lisäksi ravinnon poisto lisäsi kotiloiden kuolleisuutta. Myös muissa tutkimuksissa ympäristöstressin on havaittu lisäävän erityisesti loisittujen yksilöiden kuolleisuutta (mm. Jokela ym., 1999; Brown ym., 2000; Krist ym., 2004; Jokela ym., 2005). Sekä loisten heikentyneellä lisääntymisellä että isäntien kasvaneella kuolleisuudella voi olla merkittäviä ekologisia seurauksia, jotka voivat heijastua jopa loisten populaatiodynamiikkaan ja populaatiokokoon ympäristöstressin vähentäessä elinkierrossa seuraavien isäntien altistumista loisille. Esimerkiksi Pulkkinen & Ebert (2004) havaitsivat tutkimuksessaan, että ruokastressi ei edistänyt loisten leviämistä *Daphnia* -populaatiossa. Ruoan puutteesta johtuva stressi tappoi suurimmat yksilöt, jotka kantoivat eniten loisia. Tämän takia loisten aiheuttama isäntien kuolleisuus voi olla tärkeä tekijä loisten abundanssin säätelyssä populaatiotasolla. Ympäristön aiheuttamalla stressillä voi kuitenkin olla myös positiivisia vaikutuksia loispopulaatioihin, sillä ympäristöstressi voi lisätä isäntien altistumista loisinfektioille. Aikaisemmissa tutkimuksissa ympäristöstressin on havaittu alentavan isäntien immuunipuolustusta ja siten lisäävän alttiutta loisinfektioille (Oppliger ym., 1998; Agnew & Koella, 1999; Moret & Schmid-Hempel, 2000; Abrous ym., 2001; katso myös Mitchell & Read, 2005). Lisäksi loisilla, joilla on monimutkainen elinkierto, ympäristöstressin vaikutus loisten populaatiodynamiikkaan riippuu stressin yhteisvaikutuksesta elinkierron eri vaiheissa.

Tutkimuksessa havaittu kerkariatuotannon riippuvuus isännän kunnosta voi olla seurausta pelkästään ympäristön aiheuttamista rajoitteista loisen lisääntymiselle tai osin myös loisen plastisesta isännänkäyttöstrategiasta vaihtelevissa ympäristöolosuhteissa (Gotthard & Nylin, 1995; Pfennig, 2001; Roff, 2002). Tämä riippuu siitä, onko loisen lisääntymisessä havaittu lasku osin seurausta loisen ”päätoksesta” allokoidea rajoitettuja resursseja kerkariatuotannon sijaan toimintoihin, jotka edistävät sen lisääntymistä tulevaisuudessa. Vastaavaa on raportoitu useilla vapaana elävillä eliöillä (esim. Kaitala, 1991; Ernande ym., 2004), jotka keskeyttävät lisääntymisen huonoissa ympäristöolosuhteissa. Tässä tutkimuksessa ilman ruokaa olleiden kotiloiden ryhmässä loinen vähensi isännänkäyttöään

tuottamalla vähemmän ja huonolaatuisempia kerkarioita. Tästä huolimatta kotiloiden kuolleisuus ilman ruokaa olevien ryhmässä oli suurempaa kuin *ad libitum* -ruokituilla, joten vähentynyt isännänkäyttö ei ollut riittävää pitämään kotiloisäntää elossa. Kotiloiden kuolleisuus oli kuitenkin hidasta, joten on mahdollista, että kerkariatuoannon väheneminen voi pelastaa isännän lyhyiden stressijaksojen ylitse. Toisaalta on myös mahdollista, että vaikka ilman ruokaa olleiden kotiloiden ryhmässä absoluuttinen kerkariatuoanto väheni, niin loiset ovat voineet käyttää isännän resursseja suhteessa enemmän isännän kunnon heiketessä. Tämän ”terminal investment” hypoteesin mukaan loisen tulisi isännän kunnon huonontuessa lisätä isännänkäyttöä ja käyttää isäntä loppuun, jotta isäntä ei ehdi kuolla muihin syihin (Williams, 1966; Clutton-Brock, 1984; Jokela ym., 1999; Ericsson ym., 2001; Weladji ym., 2002). Kuitenkin jos tässä tutkimuksessa olisi kyseessä ”terminal investment”, niin isäntien kuolleisuuden olisi pitänyt kasvaa nopeasti ravintomanipulaation aloittamisen jälkeen. Lisäksi loisen isännänkäyttöstrategiaan on voinut vaikuttaa myös se, monellako loisgenotyypillä kotilot ovat infektoituneet. Loisten välinen kilpailu suosii virulentteja genotyyppejä (esim. Frank, 1996; de Roode ym., 2005), mikä voi vaikuttaa havaittuun loisten isännänkäyttöön siten, että loiset eivät vähennä kerkariatuoantoaan yhtä nopeasti ympäristöolojen heiketessä kuin, jos kilpailua ei olisi. Tutkimuksen kotilot kerättiin luonnosta, joten on mahdollista, että kotilot ovat infektoituneet useammalla kuin yhdellä loisgenotyypillä (Rauch ym., 2005).

Tässä tutkimuksessa trade-offia loisten tuottamien kerkarioiden määrän ja laadun välillä ei havaittu, vaan muuttujien välinen korrelaatio oli positiivinen. Tästä voidaan päätellä, että *Diplostomum spathaceum* -imumato pystyy samanaikaisesti panostamaan sekä kerkarioiden määrään että laatuun. Loisten tuottamien jälkeläisten määrä-laatu trade-offia on aiemmin tutkittu vain harvoin (Rossin ym., 2005; Timi ym., 2005). Myöskään aikaisemmissa tutkimuksissa loisilla ei ole havaittu trade-offia jälkeläisten määrän ja laadun välillä. Tämän on arveltu johtuvan siitä, että loiset saavat isännistään rajattomasti resursseja, jolloin loisten ei tarvitse allokoida resurssejaan eri ominaisuuksien välillä (Rossin ym., 2005; Timi ym., 2005). Työssä käyttämäni lois-isäntäsystemi eroaa aikaisempien töiden systeemeistä siten, että loiset käyttävät suuremman osuuden isännästä ravinnokseen. Loisen sporokystit täyttävät kotilon gonadit kokonaan ja siten loinen on virulentimpi kuin aikaisemmissa tutkimuksissa käytetyt loislajit. Tämän takia loinen ei saa isännältään rajattomasti resursseja käyttöönsä ja jälkeläisten määrän ja laadun välisen trade-offin tulisi näkyä selkeämmin, jos sellainen olisi. Lisäksi aiemmissa loisten

tuottamien jälkeläisten määrä-laatu trade-offia koskevissa tutkimuksissa isännille annettua ravinnon määrää ei ole manipuloitu. Trade-off munien koon ja määrän välillä on havaittu ilmenevän sellaisissa olosuhteissa, joissa yksilöiden välillä on suurta vaihtelua (esim. koossa), mutta ympäristöolosuhteissa on vain vähän vaihtelua (Christians, 2000). Haukiojan ja Hakalan (1978) mukaan ominaisuuksien välinen trade-off ei näy jos olosuhteet ovat hyvät. Tässä tutkimuksessa *D. spathaceum* -loinen pystyi panostamaan sekä tuotettujen kerkarioiden määrään että laatuun, vaikka kotilo isäntä oli ilman ruokaa. Positiivinen korrelaatio tekijöiden välillä voi johtua loisgenotyyppien välisistä laatueroista eli hyvän genotyypin omaavat yksilöt pystyvät tuottamaan paljon hyvälaatuisia kerkarioita, kun taas huonon genotyypin omaavilla loisilla sekä tuotettujen kerkarioiden määrä että laatu on alhaisempi. Tutkimuksessa havaittu positiivinen korrelaatio ei kuitenkaan täysin poissulje mahdollisuutta, että *D. spathaceum* -loisen kerkarioilla ei ole määrä-laatu trade-offia, sillä kaikkia tutkimuksen tulokseen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä ei ole voitu kontrolloida. Tutkimuksissa, joissa tutkittavia muuttujia ei manipuloida, kaikkien oleellisten muuttujien kontrollointi tai sisällyttäminen analyysiin on usein vaikeaa ja siten todellinen trade-off voi jäädä huomaamatta (Roff, 2002).

KIITOKSET

Kiitän professori Jukka Jokelaa ja FT Otto Seppälää työn ohjauksesta. Kiitoksen ansaitsevat myös FT Anssi Karvonen ja Sanna Taskinen, jotka auttoivat tutkimuksen käytännön toteutuksessa. Lisäksi kiitokset Jyväskylän yliopiston Konneveden tutkimusaseman henkilökunnalle työskentelymahdollisuuksista.

KIRJALLISUUS

- Abrous, M., Rondelaud, D. & Dreyfuss, G. 2001. The stress of *Lymnaea truncatula* just before miracidial exposure with *Fasciola hepatica* increased the prevalence of infection. *Experimental Parasitology* 99: 49-51.
- Agnew, P. & Koella, J.C. 1999. Life history interactions with environmental conditions in a host-parasite relationship and the parasite's mode of transmission. *Evolutionary Ecology* 13: 67-89.
- Bedhomme, S., Agnew, P., Sidobre, C. & Michalakis, Y. 2004. Virulence reaction norms across a food gradient. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 271: 739-744.
- Bize, P., Roulin, A., Tella, J.L. & Richner, H. 2005. Female-biased mortality in experimentally parasitized Alpine Swift *Apus melba* nestlings. *Functional Ecology* 19: 405-413.
- Brown, C.A. 2003. Offspring size-number trade-offs in scorpions: an empirical test of the van Noordwijk and de Jong model. *Evolution* 57: 2184-2190.
- Brown, M.J.F., Loosli, R. & Schmid-Hempel, P. 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* 91: 421-427.
- Brown, M.J.F., Schmid-Hempel, R. & Schmid-Hempel, P. 2003. Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *Journal of Animal Ecology* 72: 994-1002.
- Chappell, L.H., Hardie, L.J. & Secombes, C.J. 1994. Diplostomiasis: the disease and host-parasite interactions. Teoksessa: Pike, A.W. & Lewis, J.W. (toim.) *Parasitic diseases of fish*. Samara Publishing Ltd, Dyfed, 59-86.
- Charlesworth, B. 1990. Optimization models, quantitative genetics, and mutation. *Evolution* 44: 520-538.
- Choo, K., Williams, P.D. & Day, T. 2003. Host mortality, predation and the evolution of parasite virulence. *Ecology Letters* 6: 310-315.
- Clutton-Brock, T.H. 1984. Reproductive effort and terminal investment in iteoparous animals. *American Naturalist* 123: 212-229.
- Cristians, J.K. 2000. Trade-offs between egg size and number in waterfowl: an interspecific test of the van Noordwijk an de Jong model. *Functional Ecology* 14: 497-501.
- de Roode, J.C., Pansini, R., Cheesman, S.J., Helinski, M.E.H., Huijben, S., Wargo, A.R., Bell, A.S., Chan, B.H.K., Walliker, D. & Read, A.F. 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 7624-7628.
- Dobson, C. & Bawden, R.J. 1974. Studies on the immunity of sheep to *Oesophagostomum columbianum*: effects of low-protein diet on resistance to infection and cellular reaction in the gut. *Parasitology* 69: 239-255.
- Ebert, D., Carius, H.J., Little, T. & Decaestecker, E. 2004. The evolution of virulence when parasites cause host castration and gigantism. *The American Naturalist* 164: S19-S32.
- Ebert, D., Zschokke-Rohringer, C.D. & Carius, H.J. 2000. Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia* 122: 200-209.
- Ebert, D. & Herre, E.A. 1996. The evolution of parasitic diseases. *Parasitology Today* 12: 96-101.
- Eisen, R.J. 2001. Absence of measurable malaria-induced mortality in western fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) in nature: a 4-year study of annual and over-winter mortality. *Oecologia* 127: 586-589.
- Ericsson, G., Wallin, K., Ball, J.P. & Broberg, M. 2001. Age related reproductive effort and senescence in free-ranging moose, *Alces alces*. *Ecology* 82: 1613-1620.

- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J. & Haures, J. 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 342-356.
- Field, S.G. & Michiels, N.K. 2005. Parasitism and growth in the earthworm *Lumbricus terrestris*: fitness costs of the gregarine parasite *Monocystis* sp. *Parasitology* 130: 397-403.
- Frank, S.A. 1996. Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology* 71: 37-78.
- Gotthard, K. & Nylin, S. 1995. Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos* 74: 3-17.
- Hamilton, W.D. 1980. Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos* 35: 282-290.
- Haukioja, E. & Hakala, T. 1978. Life-history evolution in *Anodonta piscinalis* (Mollusca, Pelecypoda). *Oecologia*, 35: 253-266.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P. & Newborn, D. 1992. Do parasites make prey vulnerable to predation? Red grouse and parasites. *Journal of Animal Ecology* 61: 681-692.
- Hurd, H., Warr, E. & Polwart, A. 2001. A parasite that increases host lifespan. *Proceeding of the Royal Society, Series B* 268: 1749-1753.
- Jaenike, J. & Benway, H. 1995. Parasite-induced mortality in mycophagous *Drosophila*. *Ecology* 76: 383-391.
- Jokela, J., Lively, C.M., Taskinen, J. & Peters, A.D. 1999. Effect of starvation on parasite-induced mortality in freshwater snail (*Potamopyrgus antipodarum*). *Oecologia* 119: 320-325.
- Jokela, J., Taskinen, J., Mutikainen, P. & Kopp, K. 2005. Virulence of parasites in hosts under environmental stress: experiments with anoxia and starvation. *Oikos* 108: 56-164.
- Kaitala, A. 1991. Phenotypic plasticity in reproductive behaviour of waterstriders: trade-off between reproduction and longevity during food stress. *Functional Ecology* 5: 12-18.
- Karvonen, A., Kirsi, S., Hudson, P.J. & Valtonen, E.T. 2004. Patterns of cercarial production from *Diplostomum spathaceum*: terminal investment or bet hedging? *Parasitology* 129: 87-92.
- Karvonen, A., Pauku, S., Valtonen, E.T. & Hudson, P.J. 2003. Transmission, infectivity and survival of *Diplostomum spathaceum* cercariae. *Parasitology* 127: 217-224.
- Kaufman, D.W. & Kaufman, G.A. 1987. Reproduction by *Peromyscus polionatus*: number, size, and survival of offspring. *Journal of Mammalogy* 68: 275-280.
- Keas, B.E. & Esch, G.W. 1997. The effect of diet and reproductive maturity on the growth and reproduction of *Helisoma anceps* (Pulmonata) infected by *Halipegus accidualis* (Trematoda). *The Journal of Parasitology* 83: 96-104.
- Krasnov, B.R., Khokhlova, I.S., Arakelyan, M.S. & Degen, A.A. 2005. Is a starving host tastier? Reproduction in fleas parasitizing food-limited rodents. *Functional Ecology* 19: 625-631.
- Krist, A.C., Jokela, J., Wiehn, J. & Lively, C.M. 2004. Effects of host condition on susceptibility to infection, parasite developmental rate, and parasite transmission in a snail-trematode interaction. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 33-40.
- Lafferty, K.D. & Kuris, A.M. 1999. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography* 44: 925-931.
- Lemly, A.D. & Esch, G.W. 1984. Effects of the trematode *Uvulifer ambloplitis* on juvenile bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*: ecological implications. *The Journal of Parasitology* 70: 475-492.
- Lyholt, H.C.K. & Buchmann, K. 1996. *Diplostomum spathaceum*: effects of temperature and light on cercarial shedding and infection of rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 169-173.

- McDowell, J.E., Lancaster, B.A., Leavitt, D.F., Rantamäki, P. & Ripley, B. 1999. The effects of lipophilic organic contaminants on reproductive physiology and disease processes in marine bivalve molluscs. *Limnology and Oceanography* 44: 903-909.
- Mitchell, S.E. & Read, A. 2005. Poor maternal environment enhances offspring disease resistance in an invertebrate. *Proceeding of the Royal Society, Series B* 272: 2601-2607.
- Mole, S. & Zera, A.J. 1993. Differential allocation of resources underlies the dispersal-reproduction trade-off in the wing-dimorphic cricket, *Gryllus rubens*. *Oecologia* 93: 121-127.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290: 1166-1167.
- Niewiadomska, K. 1986. Verification of the life-cycles of *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) and *D. pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomidae). *Systematic Parasitology* 8: 23-31.
- van Noordwijk, A.J. & de Jong, G. 1986 Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *The American Naturalist* 128: 137-142.
- Oppliger, A., Clobert, J., Lecomte, J., Lorenzon, P., Boudjemadi, K. & John-Alder, H.B. 1998. Environmental stress increases the prevalence and intensity of blood parasite infection in the common lizard *Lacerta vivipara*. *Ecology Letters* 1: 129-138.
- Perlman, S.T. & Jaenike, J. 2003. Evolution of multiple components of virulence in *Drosophila*-Nematode associations. *Evolution* 57: 1543-1551.
- Pfennig, K.S. 2001. Evolution of pathogen virulence: the role of variation in host phenotype. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 268: 755-760.
- Polak, M. 1996. Ectoparasitic effects on host survival and reproduction: The *Drosophila*-*Macrocheles* association. *Ecology* 77: 1379-1389.
- Poulin, R. 1998. Evolutionary ecology of parasites: From individuals to communities. 212 s. Chapman & Hall. London.
- Pulkkinen, K. & Ebert, D. 2004. Host starvation decreases parasite load and mean host size in experimental populations. *Ecology* 85: 823-233.
- Rauch, G., Kalbe, M. & Reusch, B.H. 2005. How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 1069-1075.
- Roff, D.A. 2002. *Life history evolution*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, 93-150.
- Rossin, M.A., Poulin, R., Timi, J.T. & Malizia, A.I. 2005. Causes of inter-individual variation in reproductive strategies in the parasitic nematode *Graphidioides subterraneus*. *Parasitology Research* 96: 335-339.
- Price, P.W. 1980. Evolutionary biology of parasites. 237 s. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Sandland, G.J. & Minchella, D.J. 2003. Effects of diet and *Echinostoma revolutum* infection on energy allocation patterns in juvenile *Lymnaea elodes* snails. *Oecologia* 134: 479-486.
- Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E.T. 2004. Parasite-induced change in host behaviour and susceptibility to predation in an eye fluke-fish interaction. *Animal Behaviour* 68: 257-263.
- Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E.T. 2005. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Animal Behaviour* 70: 889-894.
- Sinervo, B. & Licht, P. 1991. Proximate constraints on the evolution of egg size, number, and total clutch mass in lizards. *Science* 252: 1300-1302.

- Siva-Jotky, M.T. & Thompson, J.W. 2002. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology* 27: 1-7.
- Slater, A.F. & Keymer, A.E. 1986. *Heligmosoides polygyrus* (Nematoda): the influence of dietary protein on the dynamics of repeated infection. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 229: 69-83.
- Smith, H.G., Källander, H. & Nilsson, J.Å. 1989. The trade-off between offspring number and quality in the great tit *Parus major*. *Journal of Animal Ecology* 58: 383-401.
- Sousa, W.P. & Gleason, M. 1989. Does parasitic infection compromise host survival under extreme environmental conditions? The case for *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchia). *Oecologia* 80: 456-464.
- Telfer, S., Bennett, M., Bown, K., Cavanagh, R., Crespin, L., Hazel, S., Jones, T. & Begon, M. 2002. The effects of cowpox virus on survival in natural rodent populations: increases and decreases. *Journal of Animal Ecology* 71: 558-568.
- Timi, J.T., Lanfranchi, A.L. & Poulin, R. 2005. Is there trade-off between fecundity and egg volume in the parasitic copepod *Lernanthropus cynoscicola*? *Parasitology Research* 95: 1-4.
- Tseng, M. 2004. Sex-specific response of a mosquito to parasites and crowding. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 271: S186-S188.
- 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. *Annales Zoology Fennici* 34: 47-59.
- Vance, S.A. & Peckarsky, B.L. 1997. The effect of mermithid parasitism on predation on nymphal *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera) by invertebrates. *Oecologia* 110: 147-152.
- Webberley, K.M. & Hurst, G.D.D. 2002. The effect of aggregative overwintering on an insect sexually transmitted parasite system. *The Journal of Parasitology* 88: 707-712.
- Weladji, R.B., Mysterud, A., Holland, Ø. & Lenvik, D. 2002. Age-related reproductive effort in reindeer (*Rangifer tarandus*): evidence of senescence. *Oecologia* 131: 79-82.
- Williams, G.C. 1966. Natural selection, the cost of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *American naturalist* 100: 687-690.
- Williams, P.D. & Day, T. 2001. Interactions between sources of mortality and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 268: 2331-2337.
- Zera, A.J. & Harshman, L.G. 2001. The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual review of ecology and systematics* 32: 95-126.