

Pro gradu –tutkielma

**Siian rakkoloision (*Henneguya zschokkei*) elämänkierto
sekä kehittyminen kalassa ja harvasukamadossa**

Hanna Saarikoski



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Kalabiologia ja kalatalous

26.3.2010

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Kalabiologia ja kalatalous

SAARIKOSKI HANNA, S.: Siian rakkoloision (*Henneguya zschokkei*) elämänkierto sekä esiintyminen kalassa ja harvasukamadossa

Pro gradu: 23 s.

Työn ohjaajat: Prof. Jouni Taskinen, Prof. Tellervo Valtonen

Tarkastajat: Prof. Jouni Taskinen, FT Katja Pulkkinen

Maaliskuu 2010

Hakusanat: siian rakkoloisio, *Henneguya zschokkei*, elämänkierto, Myxozoa, siika, *Coregonus lavaretus*, *Stylodrilus heringianus*, myksospoori, aktinospoori

TIIVISTELMÄ

Siian rakkoloisio (*Henneguya zschokkei*) on Myxozoa-pääjaksoon kuuluva itiöloinen. Myxozoa-loisilla on monimutkainen elämänkierto, joka pitää sisällään sekä selkärangattoman että selkärangaisen isäntäelion. Siian rakkoloision pääisäntä on harvasukamato (*Oligochaeta*) ja väli-isäntä on siika (*Coregonus lavaretus*). Rakkoloisiota on tavattu mahdollisesti myös muikulla (*C. albula*). Loisitun kalan lihaksessa on valkoisia ellipsin muotoisia kystejä, joiden sisällä on maitomaista nestettä. Neste sisältää suuren määrän mikroskooppisia kaksihäntäisiä myksospoori-itiöitä. Kalan lihaksessa voi olla useita, jopa satoja erikokoisia kystejä. Loinen aiheuttaa ongelmia niin kalanviljelyssä kuin vapaa-ajankalastuksessa. RKTL:n mukaan rakkoloisio on yksi tärkeimmistä siian viljelyn kehittymistä haittaavista tekijöistä maassamme. Loisen aiheuttamien haittojen ehkäisemiseksi elämänkierron ymmärtäminen on tärkeää.

Tutkimuksen pääkysymykset olivat: a) mikä harvasukamatolaji toimii loisen pääisäntänä, b) mikä on loisen kehittymisnopeus siiasa ja c) mikä on loisen kehittymisnopeus harvasukamadossa?

Pro gradu –tutkielmassani selvitettiin loisen harvasukamatoisäntä, kehittymisnopeus harvasukamatoisännässä ja elämänkierto kokeellisin infektoinnein. 3,5 kuukauden kuluttua harvasukamatojen infektoinnista oli ensimmäiset aktinospoorit havaittavissa 8 °C lämpötilassa. 16 °C:ssa ja infektoimattomissa kontrolleissa aktinospooreja ei kehittynyt. Isäntälajiksi paljastui *Stylodrilus heringianus*-harvasukamato, joka kuuluu Lumbriculidae-heimoon. Siian rakkoloision aktinospoori-vaihetta ei ole onnistuttu aikaisemmin havaitsemaan eikä harvasukamatoisäntää ole tunnettu.

Isäntälaji saatiin selville seuraamalla matoyksilöistä tulevaa parveilua kuoppalevyllä.

Loisen kehittymisnopeutta siiasa selvitettiin tutkimalla rakkoloisio-infektiota vuodenaikaisesti kesäkuulta syyskuulle kolmella eri siikakohortilla kalanviljelylaitoksella. Kalat olivat saaneet infektion sisämaan kalanviljelylaitoksessa. Tutkimuksessa selvisi, että uusi kystisukupolvi ilmestyy kaloihin elokuussa ja vaikka hyvin harvoin ensimmäiset infektiot olivat havaittavissa jo toisena kesänä, alkoivat loisen kystit erottua sioista pääasiassa vasta kalan kolmannen kesän aikana.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Biological and Environmental Science
Fish Biology and Fisheries

SAARIKOSKI HANNA, S.: Life cycle of *Henneguya zschokkei* and its development in fish and oligochaeta host

Master of Science Thesis: 23 p.

Supervisors: Prof. Jouni Taskinen, Prof. Tellervo Valtonen

Inspectors: Prof. Jouni Taskinen, FT Katja Pulkkinen

March 2010

Key Words: *Henneguya zschokkei*, life cycle, Myxozoa, whitefish, *Coregonus lavaretus*, *Stylodrilus heringianus*, myxospore, actinospore

ABSTRACT

Henneguya zschokkei is an aquatic parasite belonging to the phylum Myxozoa. Myxozoan parasites have two-host life cycle with an invertebrate and vertebrate host. The definitive host of *H. zschokkei* is an oligochaete and the intermediate host is whitefish, *Coregonus lavaretus*. *H. zschokkei* has been possibly observed from vendace, *C. albula*. The muscles of infected fish are occupied with tens or even hundreds of parasite plasmodium cysts which are filled with white fluid containing myxospores of the parasite. The two-tailed myxospores of *H. zschokkei* are released from cysts when fish die, and infect the oligochaete in which fish-infecting actinospores develop.

The parasite causes problems in fish farming and fisheries as it makes the fillet unacceptable for consumers. Therefore, the Finnish Game and Fisheries Research Institute has named *H. zschokkei* as one of the biggest factor hampering the development of whitefish culture in Finland. To prevent the problems caused by *H. zschokkei*, knowledge on the life cycle of the parasite is of essential importance.

The main study questions were: a.) what is the oligochaete host of *H. zschokkei*, b) what is the development rate of *H. zschokkei* in the oligochaete host and c) what is the development rate of *H. zschokkei* in whitefish?

The oligochaete host species and development of the parasite in it were studied using laboratory experiments. Parasite development in fish host was studied by monitoring cohorts of young whitefish in a fish farm. Infection experiments revealed that the oligochaete host of *H. zschokkei* was *Stylodrilus heringianus* (Lumbriculidae). Development of *H. zschokkei* in *S. heringianus* from infection to the beginning of actinospore production took 3,5 months in 8°C, but no actinospores emerged from worms kept in 16°C temperature, or in uninfected control worms. First *H. zschokkei* cysts were very rarely observed as early as in the second summer of white fish life. However, in vast majority of fish, cysts were not seen until the second summer. Every year, new *H. zschokkei* cyst generation appeared in the fish in the August when the fish were studied from June to September.

Sisältö

1. JOHDANTO.....	5
2. TUTKIMUKSEN TAUSTA.....	6
2.1 Myxosporea-luokka.....	6
2.2. Henneguya-suku.....	8
2.3. Siian rakkoloisio ja sen aiheuttamat ongelmat.....	9
3. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	10
3.1. Harvasukamatojen infektointi ja seuraaminen.....	10
3.2. Siian infektoiminen.....	11
3.3. Kalojen tutkiminen.....	11
3.4. Tilastolliset analyysit.....	11
4. TULOKSET.....	12
4.1. Harvasukamatojen infektointi.....	12
4.2. Siikojen infektointi.....	12
4.3. Kehittyminen kalassa.....	12
5. TULOSTEN TARKASTELU.....	17
5.1. Elämänkierto ja kehittyminen harvasukamadossa.....	17
5.2. Siikojen infektointi.....	19
5.3. Esiintyminen ja kehittyminen kalassa.....	19
KIITOKSET.....	20
KIRJALLISUUS.....	20

1. JOHDANTO

Myxozoa-pääjakson loisten aiheuttamien sairauksien ehkäisemisen ja hoidon kannalta elämänsykliin, loisen ja isännän vuorovaikutusten sekä loisen kehittymisen tutkiminen on kalatalouden kannalta tärkeää. Myxozoa-pääjakson loisilla on epäsuora, kaksi-isäntäinen elämänsykli, jossa pääisäntänä on selkärangaton (Annelida /nivelemaat) ja väli-isäntänä selkärangattainen (usein kala). Elämänsykli sisältää mykso- ja aktinospoorivaiheen. Suvullinen lisääntyminen tapahtuu selkärangattomassa isännässä. Nämä loiset ovat levinneet ympäri maailmaa ja aiheuttavat kaloille sairauksia sekä makeissa että merivesissä (Kent ym., 2001).

Siian rakkoloisio (*Henneguya zschokkei*) on *Henneguya*-sukuun kuuluva Myxozoa-loinen. Rakkoloisio on harvasukamato ja väli-isäntä on siika (*Coregonus lavaretus*). Rakkoloisiota on tavattu mahdollisesti myös muikulla (*C. albula*) (esim. Hyvärinen ym., 2000). Loisitun kalan lihaksessa on valkoisia ellipsin muotoisia kystejä, joiden sisällä on maitomaista nestettä. Neste sisältää suuren määrän mikroskooppisia kaksihäntäisiä myksospoori-itiöitä (Kuva 1). Kalan lihaksessa voi olla useita, jopa satoja erikokoisia kystejä.

Loinen ei ole vaarallinen ihmiselle. Loisen aiheuttama ongelma on esteettinen eikä loisittuja kaloja saa laittaa myyntiin. Varsinkin nuoremmista kaloista infektiota ei pysty havaitsemaan ennen teurastusta. Siit kasvatetaan usein myyntikokoon muutaman vuoden ajan ensin sisämaassa ja loppuaika merellä. Infektion tullessa huomatuksi vasta teurastusvaiheessa, voi suuri osa parvesta olla loisittu ja taloudellinen haitta voi koitua suureksi. Loinen aiheuttaa ongelmia niin kalanviljelyssä kuin vapaa-ajankalastuksessakin. RKTL:n mukaan rakkoloisio on yksi tärkeimmistä siian viljelyn kehittymistä haittaavista tekijöistä maassamme. Loisen aiheuttamien haittojen ehkäisemiseksi elämänsykliin ja kehitysnopeuden selvittäminen on tärkeää.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää siian rakkoloisio elämänsykliä kokeellisilla infektioilla. Siian rakkoloisio aktinospoori-vaihetta ei ole onnistuttu aikaisemmin havaitsemaan eikä harvasukamatoisäntää tunnettu. Aikaisemmin ei ole tutkittu myöskään loisen kehitysnopeutta kalassa. Tutkimme loisen esiintymistä kalanviljelylaitoksella kolmessa ikäluokassa siikoja (1+, 2+ ja 3+) ja infektion kehittymistä iän myötä.

Tutkimuksen pääkysymykset olivat: a) Mikä harvasukamatolaji toimii loisen pääisäntänä, b) Mikä on loisen kehitysnopeus siikassa ja c) Mikä on loisen kehitysnopeus harvasukamadossa?



Kuva 1. Vasemmalla: Siian rakkoloision isot kystit kuultavat siian vaalean lihan läpi, joten ne ovat helposti havaittavissa fileestä. Isoimmat kystit ovat läpimitaltaan jopa yli 2 cm. Oikealla: Siian rakkoloision myksospori-itiöt jakautuvat kystin sisällä. Se on havaittavissa eri kehitysvaiheissa olevista itiöistä sekä myös kystin koon kasvussa ajan kuluessa.

2. TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1 Myxosporea-luokka

Myxozoa-pääjakso jaetaan kahteen luokkaan pääisännän perusteella; Myxosporea, jossa pääisäntänä on harvasukamato (Oligochaeta), ja Malacosporea, jossa pääisäntänä on sammaleläin (Bryozoa). Pääisännässä loinen lisääntyy suvullisesti. Pro gradu-tutkielmani kohde, siian rakkoloisio (*H. zschokkei*), kuuluu Myxosporea-luokkaan.

Myxosporea-luokka pitää sisällään 56 sukua, joista osa on hyvin patogeenisiä makean ja suolaisen veden kaloille (Matos ym., 2005). Nämä monisoluiset loiset ovat sukua polttiaiseläimille (Cnidarian) ja aiheuttavat harmia erityisesti kaupallisella puolella infektoidessaan tärkeitä kasvatustarhoja. Luokan on raportoitu infektoivan myös mm. matelijoita, laakamatoja, maamyriä ja sammakkoeläimiä (Friedrich ym., 2000).

Myxosporea-luokan aktinospoorit on tunnettu harvasukamadon loisiksi jo 1890-luvun loppupuolelta (Stolc, 1899). Kaksi-isäntäinen elämäntyyppi saatiin selville vasta 1980-luvulla. Silloin monen loisen nimeäminen muuttui, koska aikaisemmin myksospori- ja aktinosporivaiheet oli katsottu täysin eri lajeiksi (Wolf & Markiw, 1984).

Ensimmäinen täydellinen elämäntyyppi-tutkimus saatiin tehtyä *Myxobolus cerebralis* loisella. *Tubifex tubifex* madon löytäminen pääisännäksi oli merkittävä läpimurto ja se on auttanut tutkittaessa muiden Myxosporea-loisten elämäntyyppiä (Wolf & Markiw, 1984; El-Matbouli ym., 1992). Myxosporea-loisiin kuuluu noin 2400 lajia. 40 loiselta on saatu vaihtelevalla tarkkuudella tutkittua sekä aktinospori- että myksosporivaihe (2%). 2180 loiselta tiedetään pelkkä myksospori-vaihe ja 180 lajilta ainoastaan aktinospori-vaihe (Lom & Dykova, 2006). Elämäntyyppi-tutkiminen on haastavaa, mutta tärkeää loisia tutkittaessa ja niiden aiheuttamien haittojen ennalta ehkäisemiseksi.

Loisien pääisänniksi tiedetään harvasukamadot suurimmista suvuista Naididae, Tubificidae ja Lumbriculidae sekä kahdessa tapauksessa myös monisukamadot (Polychaeta) (Kent ym., 2001). Useat tutkimukset osoittavat, että nämä loiset ovat hyvin isäntäspesifisiä. Suurimmalla osalla on vain yksi harvasukamatolaji isäntänä, vain muutamissa tapauksissa voi olla useampi mahdollisuus isännäksi (esim. El-Mansy ym., 1998; Xiao & Dessler, 1998).

Aktinospoorin vapautuminen ja siirtyminen isäntäkalaan ovat keskeiset vaiheet loisen elämänsykliä. Vapautuessaan harvasukamadon suoletta hauraalla aktinospoorilla on vastassa monia haasteita ennen pääsyä isäntään. Aktinospoorit eivät pysty liikkumaan, vaan ne keijuvat vapaasti vesivirtojen vietävinä. Ne ovat alttiita saalistukselle, vaurioitumiselle, osmoottiselle paineelle ja fysiologisille tekijöille. Todennäköisyys kohdata oikea isäntä on pieni, siksi loinen panostaakin runsaaseen parveiluun joka kestää useita päiviä (Kallert & El-Matbouli, 2008). Myös parveilun alkamisen ajankohta on tärkeä. Aktinospoorien on havaittu aktivoituvan mm. kalan limasta (Kallert ym., 2005a). Useat tutkimukset osoittavat, että aktinospoori säilyy infektiivisenä muutamasta päivästä muutamisiin viikkoihin (Markiw 1992a; Yokoyama ym., 1993; Özer & Wooten, 2002a). Lisäksi veden lämpötila korreloi useiden lajien aktinospoorien parveilun lukumäärien ja aktiivisuuksien kanssa (Özer ym., 2002b). Loisen kehittyminen harvasukamato-isännän suolessa vie lämpötilasta ja lajista riippuen useita päiviä. *M. cerebralis* parveilee 65–120 päivän kuluttua infektoinnista olosuhteista riippuen (Steinbach Elwell ym., 2009a). Useat lajit parveilevat vain tiettyyn aikaan vuodesta, jotkut ympäri vuoden aktiivisimman parveilun ollessa kuitenkin tiettyyn vuodenaikaan (Özer ym., 2002b).

Aktinospoorit poistuvat harvasukamadosta ulosteen mukana ja niiden runsaus korreloi myös sen kanssa, kuinka moni myksospoori on infektoinut madon (Markiw, 1986; Stevens ym., 2001; Steinbach Elwell ym., 2006). Väärässä harvasukamatolajissa loinen ei pysty lisääntymään ollenkaan (Steinbach Elwell ym., 2009b). Steinbach Elwell ym. (2009a) tutkimuksessa infektoitiin harvasukamatoviljelmä, jossa oli *T. tubifex* sekä *Limnodrilus hoffmeisteri* lajia. Tulos ei kuitenkaan osoittanut, että ei-isäntälajin läsnäolo vähentäisi isäntälajin infektiota. Tutkimuksessa viljelmät, joissa oli 50 yksilöä kumpaakin lajia sekä viljelmä, jossa oli pelkästään 50 *T. tubifexia*, antoivat korkeamman infektioprevalenssin kuin viljelmä, jossa oli ainoastaan 100 yksilöä *T. tubifexia*. Beauchamp ym. (2006) tutkimuksissa taas *M. cerebralis* -loiselle resistentit *T. tubifex* kannat infektoidussa viljelmässä toimivat biologisena filterinä ja vähensivät harvasukamatojen loisintaprevalenssia. *M. cerebralis* -loinen aiheuttaa tutkimuksen mukaan harvasukamadolle ongelmia lisääntymisessä, mutta vain vähän kuolleisuutta. Infektion on myös raportoitu vaikuttavan madon kasvuun (El-Matbouli & Hoffmann, 1998; Stevens ym., 2001; Hedrick & El-Matbouli 2002; Gilbert & Granath, 2003). Aktinospoorien on raportoitu tunkeutuvan kalaan pääasiassa kiduksien kautta ja ihon läpi (Yokoyama & Urawa, 1997). Myös pääisännän syöminen voi altistaa kalan infektiolle. Kalassa loisen ameebamainen sporoplasma kulkeutuu kohde-elimeen kalasta tulevien signaalien avulla (Kallert ym., 2005a).

Aktinospoorit jaetaan aktinospoorin rakenteen mukaan eri tyyppisiin. Yleisin tyyppi on triaktinomyxon. Kaikista kuvatuista aktinospooreista (yhteensä 180) 53 edustaa triaktinomyxontyyppiä. Tyypillisellä triaktinomyxon aktinospoorilla on kolme häntää ja sen sporoplasmassa on runsaasti alkiosoluja (8-256 kpl). Tämä mahdollistaa luultavasti

suuren infektiivisyyden jo vähäisellä aktinospoorimäärällä. Atkinson ym. (2009) tutkimuksen mukaan jo yksi *Myxobolus gasterostei* aktinospoori riittää infektoimaan kalan. Alkiosolujen määrää käytetään myös ryhmän jäsenten erottelussa (Stolc, 1899; Atkinson ym., 2009).

Useissa tutkimuksissa *M. cerebralis* -loisen aktinospooreja on yritetty tuhota vedestä monilla eri tavoin, kuten esimerkiksi otsonoinnilla, kloorilla sekä UV-säteilytyksellä (Markiw 1992b; Hedrick ym., 2007; Hedrick ym., 2000). Tehokkaaksi menetelmäksi on selvinnyt mm. kolmiulotteisen filtterin ja UV-säteilytyksen yhdistelmä. Tämä menetelmä on kuitenkin kallis (Arndt, 2005). Kallert ym. (2008) olivat tutkineet aktinospoorien elinkykyä. *M. cerebralis* aktinospoorien tuotto lakkasi lämpötilan ollessa 20-25 °C:ta ja taudin aiheuttamiskyky katosi kokonaan. Hyödyntäen näitä tietoja on mahdollista suunnitella metodeja, joilla aktinospoorit saataisiin eliminoitua vedestä esimerkiksi kalanviljelylaitoksilla (Wagner ym., 2003).

M. cerebralis aktinospoorin päästyä kalaan se alkaa jakautua ja kulkeutuu hermostoon. Loisen kehittymisnopeus kalassa on riippuvainen lämpötilasta, kierretaudilla se vie 52-120 päivää (Halliday, 1973; Markiw 1992a; Hedrick & El-Matbouli 2002). Tutkimusten mukaan loinen ei pysty infektoimaan kalanmätiä, koska munien kudokset ja kemialliset signaalit eivät aktivoi loista. Kalan ikä vaikuttaa infektoitumiseen; nuorien kalojen immunitetiipuoistus ja vastustuskyky eivät ole yhtä kehittynyt *M. cerebralis* -infektiota vastaan kuin vanhemmilla kaloilla (Rose ym., 2000; Putz & Hoffmann, 1966; Markiw, 1991).

Myksospoorit kestävät infektiivisnä hyvinkin pitkiä aikoja, jopa useita vuosia. El-Matbouli ym. (1992) tutkimuksessa *M. cerebralis* -loisen myksospoori säilyy jopa 20 vuotta infektiivisenä. Myksospooria ympäröi polysakkaridi-kuori (matrix), joka suojaa loista siihen kohdistuvilta fysikaalisilta ilmiöiltä, kuten lämpötilavaihteluilta (jopa jäätymiseltä) sekä kemiallisilta tekijöiltä kuten saalistajien ruuansulatuksen läpi kulkeutuminen (Hoffman & Putz, 1969; Hoffman & Hoffman, 1972; Taylor & Lott, 1978; El-Matbouli & Hoffmann, 1991). Hedrick ym. (2008) altistivat tutkimuksessaan *M. cerebralis* myksospooreja jäädytys-, kuivattamis-, UV-säteily-, kloori- ja ammoniumkäsittelyllä. Kokeessa lämpötilakäsittelyllä (5 °C lämpötilassa 60 päivää), kuivattamisella ja UV-säteilyllä oli vaikutusta myksospoorien infektiivisyyteen. Ammonium- ja kloorikäsittelyllä myksospoorit taas säilyttivät elinkelpoisuutensa.

Myxozoan-loisista on hankala päästä eroon ilman tehokkaita toimia. Yksi infektoitunut lohikala voi kuollessaan vapauttaa jopa kaksi miljoonaa *M. cerebralis* myksospooria veteen (Hedrick, 1998.). Steinbach Elwell ym. (2009a) tutkimuksessa käy ilmi, että 1-5 myksospooria riittää infektoimaan yhden harvasukamadon. Yksi kala pystyy siis infektoimaan suuren määrän harvasukamatoja. Myksospoorit pystyvät leviämään vesistöistä toisiin ja jopa eri maanosien välillä saastuneiden kalastusvälineiden, petojen, pakastettujen kalatuotteiden ja elävien kalojen sekä harvasukamatojen mukana (Arsan & Bartholomew, 2008; Gates ym., 2008).

2.2. Henneguya-suku

Taksonomisesti Henneguya *zschokkei* kuuluu pääjaksoon Myxozoa, luokkaan Myxosporia, lahkoon Bivalvulida ja heimoon Myxobolidae. Henneguya-suku on

lajimäärältään Myxosporea-luokan toiseksi suurin suku ja yksi tärkeimmistä patogeeneista makean ja suolaisen veden kaloille. Suku pitää sisällään ainakin 204 lajia (Eiras, 2002; Lom & Dykova, 2006) ja ne ovat levinneet maantieteellisesti lähes kaikkialle (Azevedo & Matos, 2003).

Toisin kuin *H. zschokkei*, useat *Henneguya*-suvun loiset muodostavat kystejä kiduksille, mikä vaikeuttaa kalan hengitystä ja lisää kuolleisuutta (Bruno ym., 2006). Aikaisemmin kolmelta *Henneguya*-suvun loiselta on saatu selvitettyä elämänsykli: *H. exilis* ja *H. ictaluri* -loisien väli-isäntä on pilkkupiikkimoppi ja pääisäntä *Dero digita*. *H. nuesslin* -loista esiintyy taimenessa sekä puronierissä ja sen pääisäntä on *T. tubifex* (Lin ym., 1999; Pote ym., 2000; Kallert ym., 2005b).

2.3. Siian rakkoloisio ja sen aiheuttamat ongelmat

Siian rakkoloisio (*H. zschokkei*) on loinen, jonka elämänsykli sisältää kaksi akvaattista isäntää. Pääisäntä on harvasukamoto ja väli-isäntänä on siika. Loista on mahdollisesti löydetty myös muikulta (Hyvärinen ym., 2000) ja vuoripyörösiasta. Epäilyksenä on ollut, että *H. zschokkei* ja *H. salminicola* olisivat sama laji (Lom & Dyková, 1992; Kent ym., 2001; Eiras 2002). Lisätutkimukset ovat tarpeen.

Koska loinen aiheuttaa kalan lihakseen valkoisia soikeita kystejä, joiden sisällä on maitomaista nestettä, on loisittuja kaloja kutsuttu kansankielellä myös piimäsiioiksi. Neste sisältää eri kehitysvaiheessa olevia jakautuvia myksospori-itiöitä. Myksosporien jakautuessa myös kystin koko kasvaa ja se syrjäyttää kalan lihaskudosta. Vapautuessaan veteen joko kalan joutuessa saaliiksi tai kuollessa, myksosporit hakeutuvat harvasukamatoon, jonka suolessa suvullinen lisääntyminen tapahtuu.

Siian viljely on uusi, kasvava elinkeino—ruokakalatuotannossa siika on Suomen toiseksi tärkein kalalaji. Riista- ja Kalatalouden tutkimuslaitoksen mukaan *Henneguya*-loisio on siian viljelyn tulevaisuutta uhkaava tekijä maassamme. Loinen ei ole vaarallinen ihmiselle eikä tartu ihmisiin tai eläimiin. Pahoin infektioitunut kala on kuitenkin myyntikelvoton. Loisitun kalan lihaa voi syödä, mutta kystit kannattaa poistaa, koska ne voivat vaikuttaa kalan makuun. Infektioitunutta kalaa ei saa missään nimessä heittää takaisin vesistöön, koska silloin loinen pääsee jatkamaan elämänsykliään. Kala kannattaa haudata tai mieluummin polttaa, jotta eläimetkään eivät pääse levittämään loista.

Siian rakkoloisioaktinosporivaihetta ei ole ennen tätä tutkimusta havaittu. Myöskään isäntä-harvasukamatolaji ei ole ollut tiedossa. Jotta loisen aiheuttamiin haittoihin voitaisiin paneutua tehokkaammin, elämänsyklin tunteminen on tärkeää.

Pro gradu -tutkielmani pääkysymykset ovat:

- a) Mikä on siian rakkoloisioharvasukamatoisäntä?
- b) Mikä on loisen kehitysvaihe harvasukamadossa eri lämpötiloissa?
- c) Mikä on loisen kehitysvaihe siivessä eri lämpötiloissa?

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1. Harvasukamatojen infektointi ja seuraaminen

Harvasukamatoja kerättiin noin tuhat kappaletta erään kalanviljelylaitoksen ulkouoman pohjalta kesä-elokuun aikana vuonna 2008. Laitoksella kasvatetaan pääasiassa kirjolohta, mutta myös siikaa. Ulkoaltaissa on muitakin kalalajeja, jotka ovat tulleet läheisestä vesistöstä veden mukana. Altaiden pohjat ovat ravinteikkaita mutapohjia, joissa on syömätöntä kalanruokaa ja kalan ulostetta. Madot kerättiin potkuhaavin avulla useasta altaasta. Pohjanäyte seulottiin 50 µm seulalla minkä jälkeen madot poimittiin yksitellen mudasta. Näytteestä löydettiin kahdeksan lajia Tarmo Timmin määrittämiseen sopivan mukaan.

Madot pidettiin muovisissa 8 l purkeissa noin 20 °C lämpötilassa. Pohjalla oli n. 2 cm samaisen laitoksen 50 µm seulalla seulottua ja autoklavoitua pohjamutaa. Joka viikko koko vesimäärä (n. 2 litraa) vaihdettiin ja ilmaston toimivuus tarkastettiin. Vesijohtoveden annettiin seisoa sangossa 8 °C:ssa noin viikko ennen matopurkkiin lisäämistä. Matoja ruokittiin pakastetulla salaattilla kerran kuussa.

Koe aloitettiin infektoimalla sekaviljelmä edellä mainittuja harvasukamatoja myksosporeilla 6.5.2009. Myksospoorit saatiin tuoreen siian lihaksessa olevista kysteistä ja ne pidettiin kylmiössä (5 °C) veteen säilöttynä 12 tuntia ennen kokeen aloittamista. Kystit hajotettiin petrimaljalle ja siihen lisättiin Jyväsjärvestä otettua vettä. Yhteen infektoitavaan matopurkkiin laitettiin 1,4 ml itiö-vesiseosta. Kontrollipurkkeihin laitettiin 1,2 ml pelkkää järvivettä. Kokeessa oli mukana kaksi eri lämpötilaa, 8 ja 16 °C. Kumpaankin lämpötilaan laitettiin kaksi infektoitua- ja kaksi kontrolliastiaa matoja. Kahden viikon kuluttua infektoinnista matoja alettiin seurata viikoittain seulomalla koko vesimäärä tiheällä 20 µm seulalla. Näytteet tutkittiin tutkimusmikroskoopin avulla 400-kertaisella suurennoksella.

Kun parveilua havaittiin ensimmäisen kerran, kyseisistä purkeista sekä niiden kontroleista tutkittiin vettä useammin kuin kerran viikossa (Taulukko 1). Aktinospoorit laskettiin joka vesinäytteestä tutkimusmikroskoopin avulla 100-kertaisella suurennoksella. Aktinospooreista otettiin kuvia ja lähetettiin etanoliin säilöttynä Kuopion yliopistoon DNA:n määrittystä (PCR ja sekvensointi) varten (FM Joose Raivo, Soveltavan biotekniikan instituutti).

Ensimmäisen infektiokokeen parveilun aikana pääisäntä ei löytynyt, joten infektiokoe toistettiin samalla menetelmällä 21.10.2009. Toisessa infektiokokeessa purkista josta havaittiin parveilua, eroteltiin madot ulkonäön perusteella neljään ryhmään. Ryhmät laitettiin litran astiaan 8 °C:iseen veteen. Matoryhmän vedet seulottiin kolmen vuorokauden päästä ja yhdessä ryhmässä näkyi reilusti aktinospooreja. Sen ryhmän madot erotettiin yksitellen 4 x 6 kuoppalevyille (Yokoyama ym. 1991 metodi), jossa oli vettä ja pakastettua salaattia. Kuoppalevyt säilytettiin 8 °C:ssa. Kuoppalevyiltä pystyi kahden vuorokauden kuluttua näkemään yksilöt, joista aktinospooreja tuli. Ne määritettiin Dos. Jukka Särkän avulla lajilleen. Yksi infektoitunut mato otettiin viinaan talteen myöhempää DNA-tutkimusta varten.

3.2. Siian infektoiminen

Aktinospooreilla kokeiltiin vuoden 2009 siianpoikasten infektointia kolmena eri kertana (Taulukko 2). Koetta varten otettiin vesi aktinospooreja sisältävästä astiasta 1 ja sen kontrollista 2 (Taulukko 1). Toisena kontrollina oli 8 °C:ista vesijohtovettä, jota oli seisotettu muutama päivä sangossa. Vedet laitettiin kolmeen n. 4 l:n astiaan johon lisättiin kala 20 minuutiksi. Ensimmäisessä infektiokokeessa (2.9.09) oli yksi infektoitava kala ja kaksi kontrollikalaa. Seuraavassa kokeessa (16.9.09) oli kaksi kalaa infektoitavana ja neljä kalaa kontrollivesissä. Viimeisessä infektiokokeessa oli neljä kalaa infektoitavana ja kahdeksan kontrolleina (21.9.09). Yhteensä aktinospoori-käsittelyn sai siis 7 kalaa ja 14 oli kontrollina. Kalat olivat yksitellen koeastioissa ja niiden vointia tarkkailtiin kokeen ajan. Vesi seulottiin ja tutkittiin infektiokokeen jälkeen 100-kertaisella suurennoksella tutkimusmikroskoopilla. Näytteestä laskettiin kuinka monen aktinospoorin sporoplasma oli tullut ulos ja kuinka monella oli ennallaan.

Kokeessa olleet kalat siirrettiin kolmeen altaaseen käsittelyn mukaan noin kahdeksi kuukaudeksi ja sen jälkeen ne pakastettiin DNA tutkimuksia varten. Niistä tulokset tulevat myöhemmin. Tutkimuksen suorittamiseen oli eläinkoelautakunnan lupa, lupanumero: ESLH-2008-10038/ym-23.

3.3. Kalojen tutkiminen

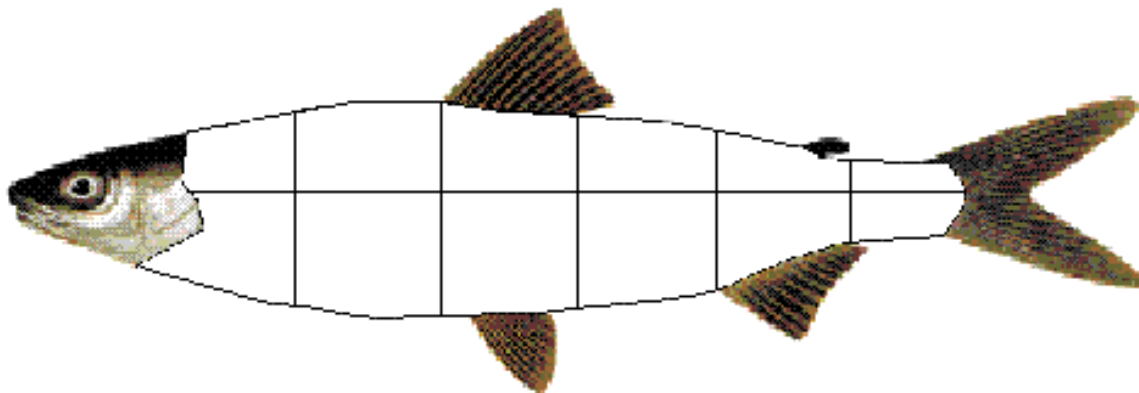
Siikojen laitosseuranta tehtiin 1,5 vuoden ajan ottamalla näytteitä eri ikäryhmistä laitoskaloja. Kaikki tutkittavat kalat olivat Kokemäen vaellussiikaa samasta laitoksesta sisäaltaista.

Kesän 2008 aikana tutkittiin 183 siikaa 3+ ikäryhmästä. Kalat punnittiin ja mitattiin. Sen jälkeen kala nyljettiin ja fileoitiin. Filee siivutettiin ohuemmiksi siivuiksi ja tutkittiin valopöydän päällä. Kystit merkittiin näkyviin kalakarttaan (Kuva 2).

Pääosa kaloista tutkittiin kesän ja syksyn 2009 aikana kahden viikon välein ikäryhmistä 2+ (n=381) ja 1+ (n=1177). 2+ kaloja tutkittiin noin 50 kappaletta ja 1+ ikäryhmän kaloja noin 100 kpl/näytteenotokerta. 2009 vuoden tutkimuksessa kala mitattiin ja punnittiin. Kalan lihas tarkastettiin silmämääräisesti rakkoloision kystien suhteen, jonka jälkeen lihas siivutettiin kahden lasin väliin litistettäväksi ja se käytiin läpi preparointimikroskoopin avulla. Isoimmista kysteistä otettiin mitat työntömitalla (kystin pituus ja leveys). Kystien paikat merkittiin ylös 12 osaan jaettuun kalakarttaan (Kuva 2). Epäselvät tapaukset varmistettiin rikkomalla kysti preparaattilasille ja tutkimalla näyte mikroskoopin avulla.

3.4. Tilastolliset analyysit

Eroja kystien määrissä lihaksiston etu-keski ja takaosien (Kuva 2) välillä selkä- ja vatsapuolilla analysoitiin ei-parametrisen Wilcoxon Signed Ranks -testin avulla, koska aineistoa ei saatu vastaamaan parametristen testien oletuksia edes erilaisia muunnoksia käyttämällä. Samaa Wilcoxon Signed Ranks -testiä käytettiin samasta syystä myös analysoitaessa eroa loisen kystien lukumäärissä selkä- ja vatsapuolen lihasten välillä.



Kuva 2. Kalakartta eli kaavake, johon *Henneguya zschokkei* -kystien lukumäärät merkittiin kalakohtaisesti. Kala jaettiin selkä- ja vatsapuolelta kuuteen osaan.

4. TULOKSET

4.1. Harvasukamatojen infektointi

21.8.2009 infektoiduista purkeista havaittiin ensimmäisen kerran aktinospoorien parveilua, kun kokeen aloittamisesta oli kulunut 107 vuorokautta (856 päiväastetta). Aktinospoorien parveilu kesti kokonaisuudessaan kuukauden (Taulukko 1). Infektoimattomissa kontrolleissa ja 16 °C:ssa olleissa purkeissa ei näkynyt aktinospooreja koko seurannan aikana.

Aktinospoorilla oli paljon alkiosoluja ja 3 pitkää häntää. Yhden hännän pituus on n. 250 mikrometriä, eli loinen läpimitaltaan lähes 500µm. Aktinospoorin tyyppi on triaktinomyxon (Kuva 3).

Toisessa infektiokokeessa määritettiin harvasukamatoisäntä lajilleen siitä ryhmästä, missä parveilua esiintyi. Siian rakkoloision pääisännäksi paljastui *Stylodrilus heringianus*, joka on puhtaiden ja kylmien vesien laji (suullinen tiedonanto, Jukka Särkkä) (Kuva 6).

Aktinospoorien DNA:n sekvenssi vastasi rakkoloision myksospoorien DNA:ta (suullinen tiedonanto, Joose Raivo).

4.2. Siikojen infektointi

Kalan läsnä ollessa osa aktinospooreista oli ampunut sporoplasman ulos. Näytteestä löytyi myös ehjiä aktinospooreja (Taulukko 2). Kontrollinäytteissä ei ollut aktinospooreja.

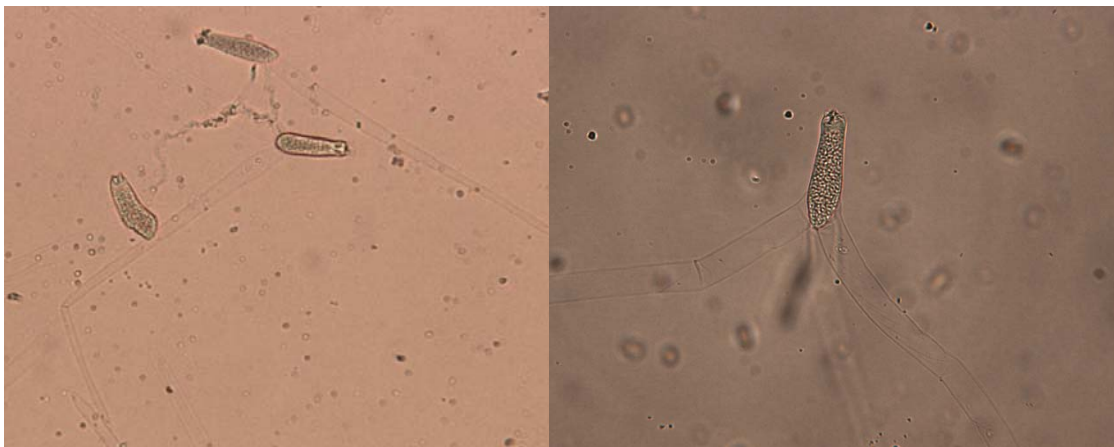
4.3. Kehittyminen kalassa

Kystit alkavat kehittyä näkyviksi nuoren kalan lihaksessa aikaisintaan toisen kesän loppupuolella (1+ ikäisissä kaloissa). Infektion näkyminen toisen kesän siassa oli kuitenkin erittäin harvinainen ilmiö, sillä 1177:sta tutkitusta kalasta vain kahdella

yksilöllä (0,17 %:lla kaloista) havaittiin infektio—yksi pieni kysti molemmissa tapauksissa. Molemmat havainnot tehtiin elokuussa. Suurimmalla osalla kaloista infektio on kuitenkin havaittavissa vasta kolmantena kesänä (ikä 2+) (Taulukko 3). Elokuun alussa kaikissa ikäryhmissä (3+, 2+ ja 1+) alkoi näkyä uutta *H. zschokkei* -sukupolvea sekä 2008 että 2009 kesien kala-aineistoissa. Pienimmät kystit olivat vain mikroskoopilla havaittavissa. Isommat erotti paljain silminkin. Jopa pienimmissä kystinaluissa näkyi mikroskoopin avulla myksospooreja. Jopa pienimmissä kysteissä näkyi mikroskoopin avulla myksospooreja. Pienissä kysteissä oli tyypillistä hyytelömäinen rakenne ilman isommissa kysteissä havaittavaa ”kuorta” (Kuva 4).

Elokuun alusta lähtien loisintaprevalenssi ikäryhmässä 2+ oli korkea, 22-37 % (Taulukko 3), mutta kystien määrä kalayksilöiden välillä vaihteli suuresti (minimi 0, maksimi 101). Loisintaprevalenssi vuonna 2008 tutkituissa 3+ ikäryhmän kaloissa (7-27 %) oli pienempi kuin 2+ ikäryhmässä (Taulukko 4). 3+ ikäryhmässä näkyi kystejä koko seurantajakson ajan (kesä-elokuu 2008). Uusi loissukupolvi oli havaittavissa elokuussa, jolloin lihakseen ilmestyi selkeästi pienempiä kystejä isompien rinnalle.

Selkä- ja vatsapuoli eroavat kystien lukumääriltä toisistaan siten, että selkäpuolella kystimäärät ovat korkeammat ($6,1 \pm 9,0$, $n = 43$.) kuin vatsapuolella ($4,7 \pm 9,3$, $n = 58$) (Wilcoxon Signed Ranks Test, $Z = -2,444$, $p = 0.015$). Sekä selkä- että vatsapuolella loisen kystejä oli eniten kalan keskiosisan paksuissa kylkilihaksissa (alueet 2-5) (Kuva 5, taulukot 5 ja 6). Vatsapuolella lisäksi alueet 2-4 erosivat alueesta 5.



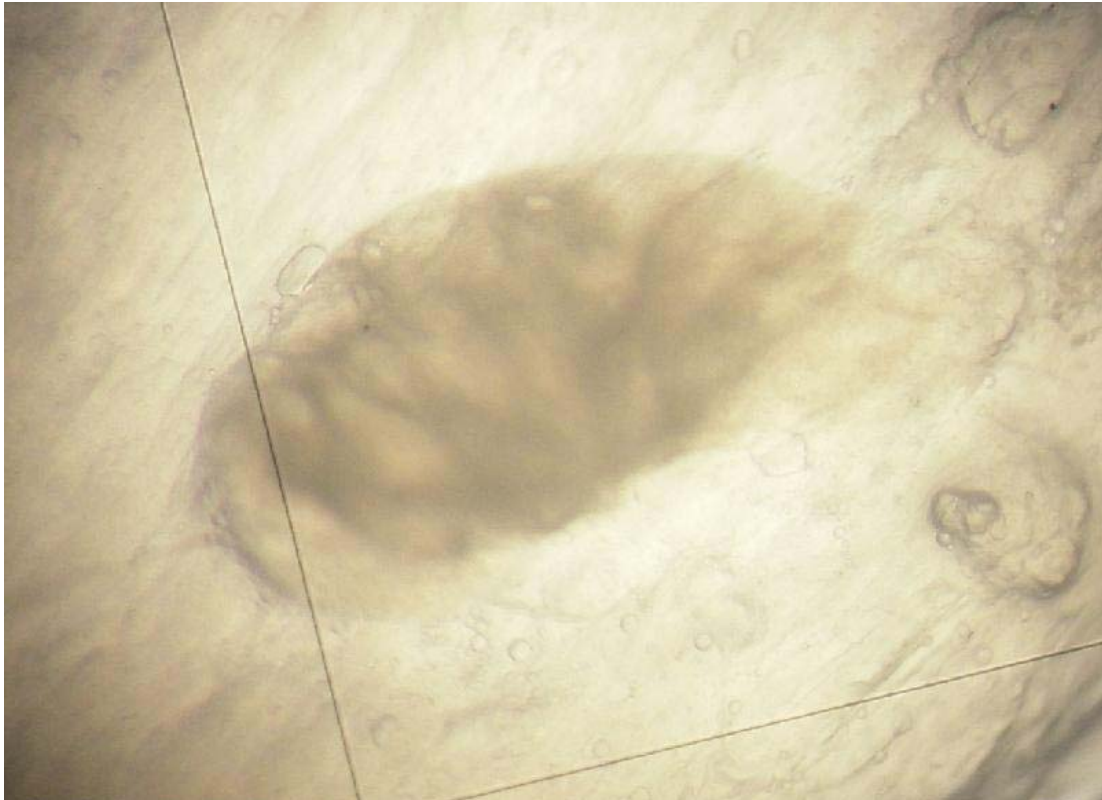
Kuva 3. *Henneguya zschokkei* aktinospoorit ovat hyvin läpikuultavia.

Taulukko 1. Aktinospoorien parveilu kokeellisesti infektoiduista harvasukamadoista ("ensimmäinen koe"). Aktinospooreja havaittiin ensimmäisen kerran 21.8.2009 purkeissa nro 1 ja 5, jonka jälkeen näitä purkkeja ja niiden kontrolleja tutkittiin useammin. Luvut kertovat aktinospoorien lukumäärän kullakin näytteenotto kerralla koko vesimäärässä. Parveilu kesti kuukauden. Purkista nro 1 tuli eniten aktinospooreja. Purkista nro 5 parveilu loppui kahden näytteenottokerran jälkeen. Vesien tutkimista jatkettiin 11.12.2009 saakka.

Purkki	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Käsittely	inf.	kontr.	inf.	kontr.	inf.	kontr.	inf.	kontr.
Lämpötila	8	8	16	16	8	8	16	16
19.5-16.8 1x/vko	0	0	0	0	0	0	0	0
21.8.	3	0	0	0	2	0	0	0
25.8.	500	0	0	0	20	0	0	0
27.8.	5	0	-	-	0	0	-	-
1.9.	10	0	0	0	0	0	0	0
2.9.	220	0	-	-	0	0	-	-
4.9.	4	0	-	-	0	0	-	-
7.9.	0	0	0	0	0	0	0	0
16.9.	1	0	-	-	0	0	-	-
18.9.	179	0	0	0	0	0	0	0
21.9.	33	0	0	0	0	0	0	0
25.9-11.12 1x/vko	0	0	0	0	0	0	0	0

Taulukko 2. Siikojen infektoinnissa käytettyjen kalojen sekä sporoplasmansa tyhjentäneiden aktinospoorien lukumäärät. Siian infektiokokeessa osa aktinospooreista oli tyhjentänyt sporoplasman kalan läsnä ollessa.

	kala		aktinospoori	
	infektoidut (n)	kontrollit (n)	tyhjentynyt	ei-tyhjentynyt
2.9.09	1	2	11	209
16.9.09	2	4	1	0
21.9.09	4	8	16	17



Kuva 4. Pienempiin rakkoloision kysteihin ei ollut vielä muodostunut ”kuorta” vaan rakenne muistutti enemmän hyytelömäistä rakkulaa.

Taulukko 3. Tutkittujen 2+ ikäryhmän siikojen lukumäärät, loisittujen kalojen lukumäärä ja osuus (%) sekä loisinnan intensiteetti (loisia per loisittu kala), minimi ja maksimi eri näytteenottokerroilla. Kalojen infektiota pystyi havaitsemaan aikaisintaan elokuun alussa.

Pyyntipvm	N	loisitut	loisinta%	Intensiteetti	S.D.	S.E.	min.	max
2.6.09	50	0	0	0	0	0	0	0
11.6.09	50	0	0	0	0	0	0	0
29.6.09	50	0	0	0	0	0	0	0
13.7.09	51	0	0	0	0	0	0	0
3.8.09	50	15	30	8,3	10,0	2,6	1	39
13.8.09	50	11	22	8,7	10,7	3,1	1	34
24.8.09	50	12	24	18,9	10,2	3,1	1	101
7.9.09	30	11	37	9,3	13,1	3,9	1	41

Taulukko 4. Tutkittujen 3+ ikäryhmän siikojen lukumäärät, loisittujen kalojen lukumäärä ja osuus (%) sekä loisinnan intensiteetti (loisia per loisittu kala), minimi ja maksimi eri näytteenottokerroilla. 3+ ikäryhmässä näkyi rakkoloista jo alkukesästä todennäköisesti jäänteinä edellisen kesän loisinnasta. Elokuussa alkoi näkyä uutta *Henneguya zschokkei* -kystisukupolvea. Käytetty tutkimusmenetelmä 3+ ikäryhmän kalojen kohdalla oli epätarkempi kuin 2+ -kaloilla, joten tulokset eivät ole suoraan vertailukelpoisia keskenään.

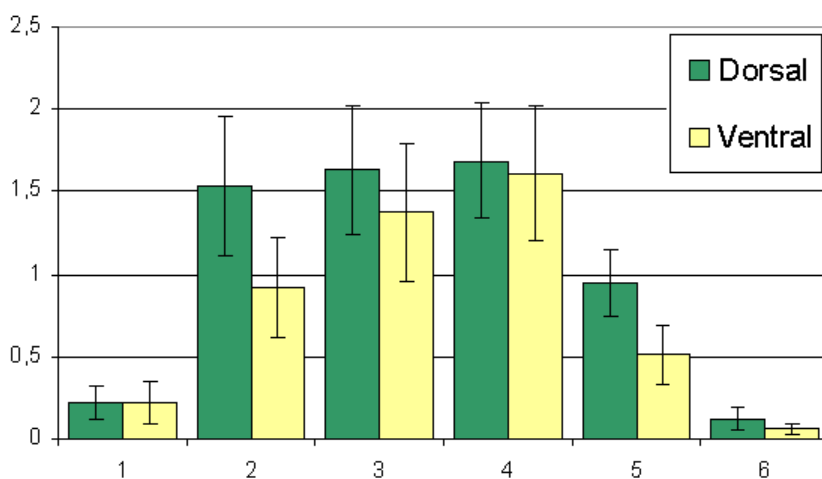
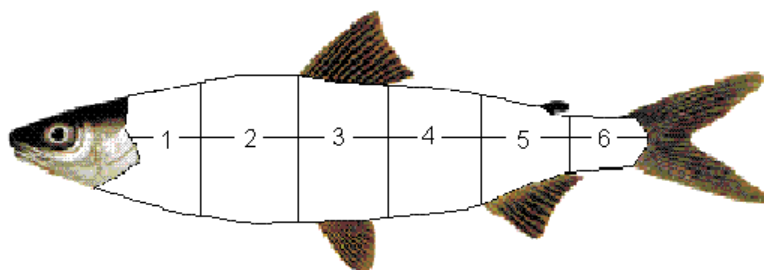
Pyynti	N	loisitut	loisinta%	Intensiteetti	S.D.	S.E.	min.	max
Kesäkuu	43	10	23	6,4	6,9	0,7	1	24
Heinäkuu	72	5	7	14,4	11,9	0,3	1	32
Elokuu	49	13	27	7	6,9	0,6	1	28

Taulukko 5. *Henneguya zschokkei* -kystien lukumäärien välisten erojen tilastollinen merkitsevyys parittaisissa vertailuissa 2+ ikäryhmässä selkäpuolen kystien sijoittuminen kalakartassa (Kuva 5). Tilastollisesti merkitseväksi eroksi määritettiin Bonferronin korjauksen jälkeen $0,05/15=0,0033$.

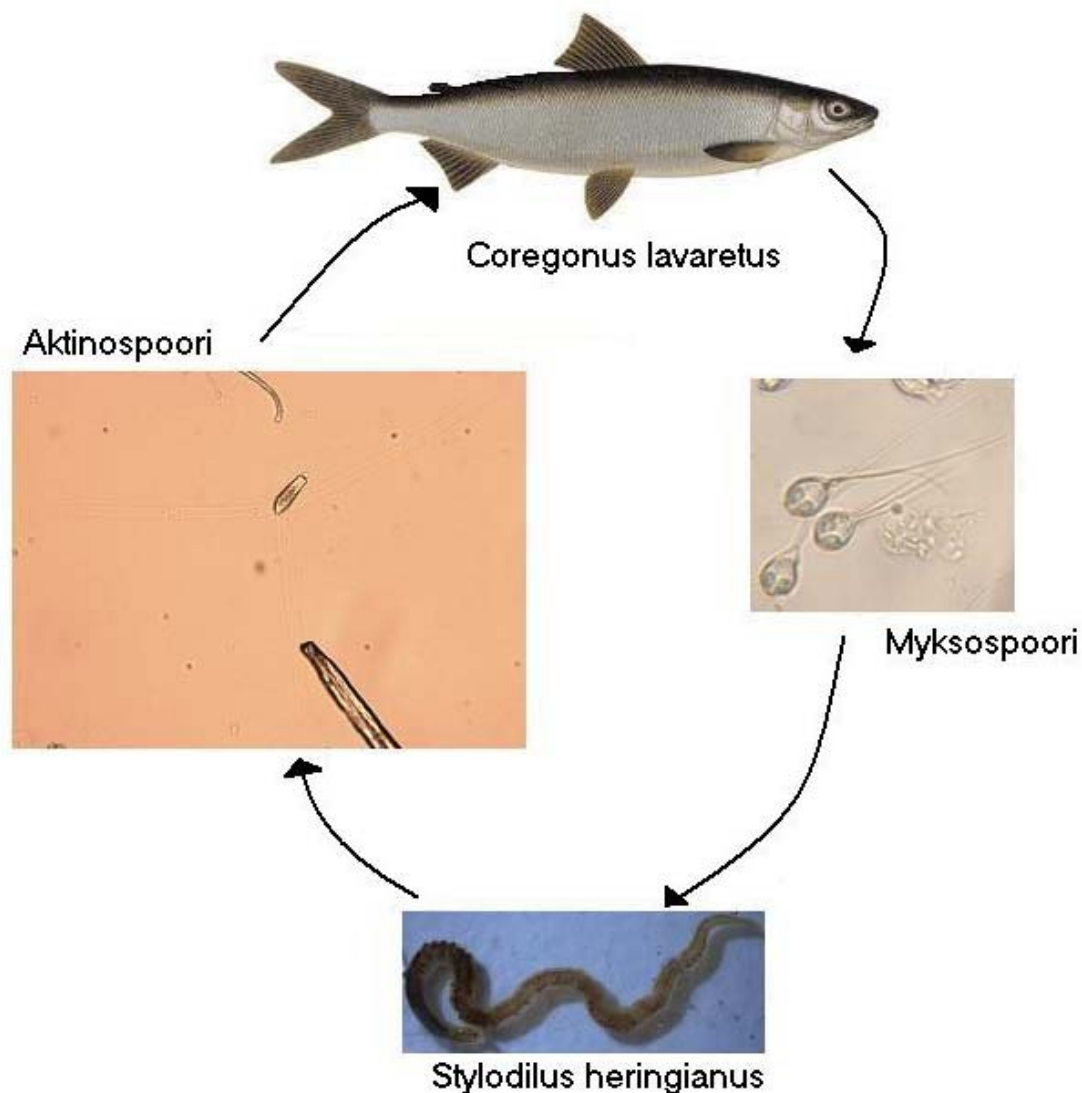
	1	2	3	4	5	6
1	*	<0,0033	<0,0033	<0,0033	<0,0033	0,436
2		*	0,505	0,194	0,257	<0,0033
3			*	0,56	0,088	<0,0033
4				*	0,017	<0,0033
5					*	<0,0033
6						*

Taulukko 6. 2+ ikäryhmässä *Henneguya zschokkei* -kystien lukumäärien välisten erojen tilastollinen merkitsevyys parittaisissa vertailuissa vatsapuolen kystien sijoittuminen kalakartassa (Kuva 5). Tilastollisesti merkitseväksi eroksi määritettiin Bonferronin korjauksen jälkeen $0,05/15=0,0033$.

	1	2	3	4	5	6
1	*	< 0,0033	< 0,0033	< 0,0033	0,05	0,096
2		*	0,038	0,014	0,159	< 0,0033
3			*	0,06	0,009	< 0,0033
4				*	< 0,0033	< 0,0033
5					*	< 0,0033
6						*



Kuva 5. Infektoituneilla siioilla 2+ ikäryhmässä *Henneguya zschokkei* -kystien lukumäärien keskiarvot (y-akseli) (\pm keskivirhe) selkä (dorsal)- ja vatsapuolelle (ventral) alueilla 1-6 (x-akseli) kalan etupäästä takapäähän. Suurin osa kysteistä sijoittui kalan keskiosaan.



Kuva 6. Siian rakkoloisioin (*Henneguya zschokkei*) elämänsykli pitää sisällään harvasukamadon, *Stylodrilus heringianus*, ja siian, *Coregonus lavaretus*, sekä siian harvasukamatoon siirtyvän itiön, myksospoorin ja harvasukamadosta siikaan tulevan itiön, aktinospoorin.

5. TULOSTEN TARKASTELU

5.1. Elämänsykli ja kehittyminen harvasukamadossa

Harvasukamatojen infektiokokeessa löytyi *Henneguya zschokkei* -aktinospoori. Päätelmälle saatiin tukea koasetelman ja DNA-määrityksen avulla, sillä infektoimattomissa kontroleissa ei tapahtunut aktinospoorien tuotantoa ja aktinospoorien sekä siian otetun myksospoorin DNA:t vastasivat sekvenssiltään toisiaan 100 %:sti (FM Joose Raivo, Kuopion yliopisto). Myös koko vastasi toisen *Henneguya*-sukuisen loisen aktinospoorin kokoa (*H. nuesslin*:lla n. 250 μm). Harvasukamatojen sekaviljelmistä saatiin erilaiset parveilutulokset, josta voi päätellä, että loinen on isäntäspesifinen. Sen

vahvasti myös se, että toistetun infektiokokeen harvasukamadoista ei löytynyt muita lajeja, joista olisi parveillut aktinospooreja.

Henneguya zschokkei -loisen pääisännäksi paljastui *Stylodrilus heringianus* -harvasukamato, joka on kylmien ja puhtaiden vesistöjen laji (Dos. Jukka Särkkä, suullinen tiedonanto) kuten siikakin. Timmin (1999) määritysoppaan mukaan tätä lajia esiintyy erityisesti joissa ja lähteissä. Kyseessä on iso, 25-60 mm pitkä harvasukamato, joka kuuluu Lumbriculidae-heimoon. Heimossa esiintyy seksuaalisen lisääntymisen lisäksi aseksuaalista lisääntymistä, madon katketessa syntyy tytärmatoja (Timm, 1999). Atkinson ym. (2009)_tutkimuksien mukaan aseksuaalisesti lisääntyvä *Nais communis* -harvasukamatolajin jakautuessa tytärmadoiksi, infektio säilyy kummallakin osapuolella. Näin loisen määrä kasvaa harvasukamatojen joukossa, vaikka uusia myksospooreja ei olisikaan saatavilla. Morris ja Adam (2005) ovat huomanneet saman myös Lumbriculidae-suvun madoilla. Loinen hyötyy tästä tilanteesta, koska infektioiden määrä kasvaa matojen lisääntyessä. Siitä on myös apua erityisesti silloin, kun kalaisäntiä on vähän sekä leviämisen suhteen, useat Lumbriculidae-suvun madot pystyvät liikkumaan myös uimalla (Anderson & May, 1981; Timm, 1999). *S. heringianus* on esiintynyt kirjallisuudessa myös muiden Myxosporea-luokan loisten pääisäntänä. Tämän tutkimusten tulosten perusteella ei voida täysin sulkea pois mahdollisuutta, että myös joku toinen tai jotkut muut harvasukamatolajit voisivat toimia rakkoloision pääisäntinä. Koska muista harvasukamatolajeista (kahdeksan eri tyyppiä/lajia) ei aktinospooreja tässä tutkimuksessa parveillut, antaa se tukea oletukselle, että *S. heringianus* on *H. zschokkei* -loisen ainoa harvasukamatoisäntälaji.

Purkkien erilaiset parveilumäärät voivat kertoa sekaviljelmän vaikutuksesta parveiluun. Tutkimuksessa (Steinbach Elwell ym., 2009b) on havaittu, että väärän isäntä-harvasukamadon syödessä myksospoorin, loinen voi tarttua suolen pintaepiteeliin, mutta ei pysty lisääntymään. Isäntälaji saattoi olla jakautunut eri suhteissa sekaviljelmiin, jolloin myös parveilutulokset olivat erilaisia.

Lämpötilalla oli merkitystä parveiluun, koska kokeessa vain viileämmässä (8 °C) lämpötilassa ilmeni aktinospoorien parveilua. 16 °C näyttäisi tämän tutkimuksen perusteella olevan liian korkea lämpötila rakkoloision kehittymiselle harvasukamatoisännässä. Tämä tulos sopii yhteen sen tiedon kanssa, että sekä *S. heringianus* että siika suosivat elinympäristönään viileätä vettä.

Tulokset ovat erittäin merkittäviä sekä tieteellisesti että kalataloudellisesti. Kysymyksessä on ensimmäinen kerta maailmassa, kun rakkoloision aktinospoorivaihe on löydetty ja kuvattu sekä osoitettu kokeellisin infektoinnein ja DNA-tutkimusten avulla, että loisen harvasukamatoisäntänä toimii *Stylodrilus heringianus*. Vaikka Myxozoa-loisia on arvioitu olevan olemassa n. 2400 lajia, vain hyvin harvojen elämäkierrosta ja harvasukamatoisännistä on tarkempaa tietoa. Tutkimus on siten oleellinen lisä akvaattisten loisten elämänsyklien tuntemuksessa globaalisti, koska *H. zschokkei* ja sen tyyppiset Myxozoa-loiset esiintyvät siika- ja lohikaloissa maailmanlaajuisesti. Tutkimustulokset ovat myös ratkaiseva läpimurto rakkoloision aiheuttamien haittojen ehkäisemiseksi tehtävässä työssä. Ilman tietoa isännistä ja elämänsyklistä on vaikea suunnitella minkään loisen estämiseksi tehtäviä toimenpiteitä. Aktinospoorien suuren koon (haarakkeineen noin 500 µm) takia loista pystyttäisiin ehkäisemään kalanviljelylaitoksilla suodattamalla tulovesi, jos loisiintuminen laitoksella aiheutuu

tuloveden mukana yläpuolisesta vesistöistä tulevista aktinospooreista—taikka tuhoamalla aktinospoorit tulovedestä muulla tavoin. Tulevaisuudessa tulisi tutkimusta suunnata esimerkiksi sen selvittämiseen, kuinka helposti aktinospoorit tarttuvat erilaisille suodattimille, pystytäänkö niitä tappamaan UV-säteilytyksellä taikka hajottamaan ultraäänilaitteilla (esim. kasviplanktonin hajottamiseen kehitelty UltraSonic-laite). Myös tässä tutkimuksessa saatu tulos loisen kehittymisen estymisestä harvasukamadoissa 16 °C lämpötilassa voi mahdollistaa keinoja loisen kontrollointiin lämpötilan säätelyn avulla. Tutkimalla tulevaisuudessa tarkemmin loisen kehittymiseen vaikuttavia tekijöitä *S. heringianus* –harvasukamadossa voidaan mahdollisesti löytää lisää keinoja rakkoloision aiheuttamien haittojen ehkäisemiseksi. Tämä on tärkeä tavoite, sillä siian viljely on ehkä potentiaalisin uusi ruokakalatuotannon suunta kalaviljelyalalla Suomessa ja rakkoloisio on yksi tärkein siian viljelyn kehittämistä ja lisäämistä haittaava tekijä.

5.2. Siikojen infektointi

Kalan läsnä ollessa osa aktinospooreista oli työntänyt sporoplasman ulos. Kallertin ym. (2007) tutkimuksissa oli havaittu sama ilmiö aktinospoorin ollessa kalan lähellä. Ensimmäisessä infektiokokeessa oli vain yksi koekala. Seuraavassa kokeessa infektiopurkin vedessä käytettiin kaksi ja viimeisessä yhteensä neljä kalaa. Koska aktinospoorit olivat kahdessa jälkimmäisessä kokeessa useamman siian kanssa kosketuksissa (ajallisesti kauemmin), on sporoplasman ampuneiden osuus suurempi kuin ensimmäisellä infektiokerralla. Selvää kuitenkin oli, että jokaisessa kokeessa aktinospoorit reagoivat kalaan.

Kalojen mahdollisesta infektoitumisesta ei ole käytettävissä vielä tietoa, koska kalat on pakastettu infektion selvittämiseksi myöhemmin molekyylibiologisilla menetelmillä.

5.3. Esiintyminen ja kehittyminen kalassa

Rakkoloision esiintyminen tutkimissani laitoskaloissa oli hyvin yleistä. Rakkoloisiota esiintyi sekä ulkona olevissa maa-altaissa että hallissa sijaitsevissa muovialtaissa. Useimmissa kaloissa oli kuitenkin vain muutama kysti ja pahoin infektoituneet yksilöt olivat harvassa. Tulokset osoittivat, että sisäaltaissa siian poikasten kasvattaminen ei estä siian rakkoloision infektiolta, jos vesi tulee vesistöistä jossa rakkoloista esiintyy.

Kystit olivat sijoittuneet pääosin kalan keskiosaan. Selkä- ja vatsapuolella oli havaittavissa vain pientä eroa siten, että selkäpuolella kystimäärät olivat korkeampia. Tämä voi johtua siitä, että selkäpuolella on suuremmat lihakset. Pulkkinen (1994) on Pro gradu -tutkielmassaan huomannut, että myös haukimadot ovat sijoittuneet usein selkälihakseen.

Kesällä 2008 tutkitut kalat eivät olleet infektioprevalenssin suhteen vertailukelpoisia vuoden 2009 aikana tutkittuihin siikoihin, koska vuonna 2008 tutkimusmenetelmä oli epätarkempi ja pienimmät kystit saattoivat jäädä huomaamatta. Kummankin vuoden aineistosta on kuitenkin havaittavissa se, että elokuussa alkoi näkyä uutta kystisukupolvea kaikissa kolmessa ikäryhmässä. Koko aineistossa on tuloksena myös, että kystit tulevat näkyviin aikaisintaan kalan toisena kesänä. Suurimmalla osalla infektiota on kuitenkin havaittavissa kolmannen kesän elokuussa, jolloin uusi kystisukupolvi näkyy vanhemmissakin kaloissa. Tästäkin voisi päätellä, että rakkoloision

aktinospoorit parveilevat mahdollisesti tiettyyn aikaan vuodesta.

Tulokset loisen kehittymisestä kalassa ovat kalataloudellisesti merkittäviä. Ongelmana rakkoloision suhteen nykyään kalanviljelyssä on se, että infektiot havaitaan vasta kun kala fileoidaan. Tällöin huomattava osa kalaparvesta voi mennä hukkaan. Tässä tutkimuksessa osoitetaan, että mikroskooppisin menetelmin loiset ovat havaittavissa vasta kolmantena kasvukautena. Tämä auttaa osaltaan diagnosoimaan loistilanteen kasvatettavassa parvessa. Tulos kuitenkin osoittaa, että loisen varhaiseksi diagnosoimiseksi tulee kehittää vaihtoehtoisia menetelmiä, esimerkiksi PCR-tekniikoita.

KIITOKSET

Kiitän professori Jouni Taskista gradun kannustavasta ohjauksesta. On ollut ilo tehdä töitä tässä projektissa. Lisäksi kiittäisin Jyväskylän yliopiston henkilökuntaa ja harjoittelijoita, Tellervo Valtosta, Joose Raivoa, Tiina Pitkänen-Arsiolaa sekä RKTL:n työntekijöitä ja prof. M. El-Matboulin ryhmää yhteistyöstä ja avusta. Haluaisin osoittaa kiitoksen myös perheelleni ja läheisilleni saamastani tuesta.

KIRJALLISUUS

- Anderson, R.M. & May, R.M., 1981. The population dynamics of microparasites and their hosts. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B* 291: 451-524.
- Arndt, R. 2005. Pilot project at Midway Hatchery to evaluate several whirling disease filtration techniques. *Utah Division of Wildlife Resources Fisheries Experiment Station Ichthyogram* 16: 1-3.
- Arsan, E.L. & Bartholomew, J.L. 2008. Potential for Dissemination of the Nonnative Salmonid Parasite *Myxobolus cerebralis* in Alaska. *Journal of Aquatic Animal Health* 20: 136-149.
- Atkinson, S.D. & Bartholomew, J.L. 2009. Alternate spore stages of *Myxobilatus gasterostei*, a myxosporean parasite of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) and oligochaetes (*Nais communis*). *Parasitol. Res.* 104: 1173-1181.
- Azevedo, C. & Matos, E. 2003. Fine structure of *Henneguya pilosa* sp. N. (Myxozoa: Myxosporidia), parasite of *Serrasalmus altuvei* (characidae), in Brazil. *Folia parasitologica* 50: 37-42.
- Beauchamp, K.A., El-Matbouli, M., Gay, M., Georgiadis, M.P., Nehring, R.B. & Hedrick, M.P. 2006. The Effect of cohabitation of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) populations on infection to *Myxobolus cerebralis* (Myxosoma: Myxobolidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 1-8.
- Bruno, D.W., Nowak, B. & Elliott, D.G. 2006. Guide to the identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Diseases of Aquatic Organisms* 70: 1-36.
- Eiras, J.C. 2002. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*. 52: 43-54.
- El-Mansy, A., Székely C., & Molnár, K. 1998. Studies the occurrence of actinosporean stages of fish myxosporidia in a fish farm of Hungary, with the description of triactinomyxon, raabeia, aurantiactinomyxon and neoactinomyxon types. *Acta Vet Hung.* 46: 259-284.

- El-Matbouli, M., & Hoffmann, R.W. 1991. Effects of freezing, aging, and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores. *Journal of Aquatic Animal Health* 3:260-262.
- El-Matbouli, M., Fischer-Scherl, T. & Hoffmann, R.W. 1992. Present knowledge of the life cycle, taxonomy, pathology, and therapy of some Myxosporidia spp. Important for freshwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 367-402.
- El-Matbouli, M. & Hoffmann, R.W. 1998. Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*. *International Journal for Parasitology* 28: 195-217.
- Friedrich, C., Ingolic, E., Freitag, B., Kastberger, G., Hohmann, V., Skofitsch, G., Neumeister, U. & Kepka, O. 2000. A myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole *Talpa europaea* L., 1758. *Parasitology*, 121: 483-492
- Gates, K.K., Guy, C.S., Zale, A.V.J & Horton, T.B. 2008. Adherence of *Myxobolus cerebralis* myxospores to waders implications for disease dissemination. *North American Journal of Fisheries Management* 28: 1453-1458.
- Gilbert, M.A. & Granath, W.O. Jr. 2003. Whirling disease of salmonid fish: Life cycle, Biology, and disease. *Journal of Parasitology* 89: 658-667.
- Halliday, M.M. 1973. Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. (roomalainen kakkonen). Development and pathology of *myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures. *Nordisk veterinærmedicin* 25: 349-358.
- Hedrick, R.P. 1998. Relationships of the host, pathogen, and environment: Implications for diseases of cultured and wild fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 107-111.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Marty, G.D., Mukkatira, K., Antonio, D.B., Andree, K.B., Bukhari, Z. & Clancy, T. 2000. Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 53-59.
- Hedrick, R.P. & El-Matbouli, M. 2002. Recent advances with taxonomy, life cycle, and development of *Myxobolus cerebralis* in the fish and oligochaeta hosts. Pages 45-54 in J.L. Bartholomew and J. C. Wilson, editors. Whirling disease: Reviews and current topics. American Fisheries Society, Symposium 29, Bethesda, Maryland.
- Hedrick, R.P., Petri, P., McDowell, T.S., Mukkatira, K. & Sealey, L.J. 2007. Evaluation of doses of ultraviolet irradiation to inactivate waterborne actinospore stages of *Myxobolus cerebralis*. *Dis. Aquat. Org.* 74: 113-118.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Mukkatira, K., McConnel, E. & Petri, B. 2008. Effects of Freezing, Drying, Ultraviolet Irradiation, Chlorine, and Quaternary Ammonium Treatments on the Infectivity of Myxospores of *Myxobolus cerebralis* for *Tubifex tubifex*. *Journal of Aquatic Animal Health* 20: 116-125
- Hoffman, G.L., & Putz, R.E. 1969. Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. *The Progressive Fish-Culturist* 31:35-37.
- Hoffman, G.L.S., & Hoffman, G.L.J. 1972. Studies of the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). I. The effects of chemicals on spores *in vitro*, and of calcium oxide as a disinfectant in simulated ponds. *Journal of Wildlife Diseases* 8:49-53.

- Hyvärinen, P., Sutela, T. & Korhonen, P. 2000. Combining fishery prohibition with stocking of landlocked salmon, *Salmo salar* L.: an effort to gain bigger yield and individual size. *Fisheries Management and Ecology* 7: 503-514.
- Kallert, D.M., El-Matbouli, M. & Haas, W. 2005a. Polar filament discharge of *Myxobolus cerebralis* actinospores is triggered by combined non-specific mechanical and chemical cues. *Parasitology* 131: 609-616.
- Kallert, D.M., Eszterbauer, E., El-Matbouli, M., Erséus, C. & Haas, W. 2005b. The life cycle of *Henneguya nuesslini* Schuberg & Schröder, 1905 (Myxozoa) involves a triactinomyxon-type actinospore. *Journal of Fish Diseases* 28: 71-79.
- Kallert, D.M., Ponader, S., Eszterbauer, E., El-Matbouli, M. & Haas, W. 2007. Myxozoan transmission via actinosores: new insights into mechanisms and adaptations for host invasion. *Parasitology* 134: 1741-1750
- Kallert, D.M. & El-Matbouli, M. 2008. Differences in viability and reactivity of actinospores of three myxozoan species upon ageing. *Folia parasitologica* 55: 105-110.
- Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.L., El-Matbouli, M., Dessler, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffmann, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., Lester, R.J.G., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M.E. & Xiao, C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 395-413
- Lin, D., Hanson, L.A. & Pote, P.M. 1999. Small subunit ribosomal RNA sequence of *Henneguya exilis* (class Myxosporea) identifies the actinosporean stage from an oligochaeta host. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 66-68.
- Lom, J. & Dykova, I. 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia parasitol* 49: 158
- Markiw, M.E. 1986. Salmonid whirling disease: Dynamics of experimental production of the infective stage- the triactinomyxon spore. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43: 521-526.
- Markiw, M.E. 1991. Whirling disease: Earliest susceptible age of rainbow trout to the triactinomyxid of *Myxobolus cerebralis*. *Aquaculture* 92: 1-6.
- Markiw, M.E. 1992a. Experimentally induced whirling disease 1(roomalainen).Dose response of fry and adults of rainbob trout exposed to triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis*. *J. Aquat. Anim. Health* 4. 40-43.
- Markiw, M.E. 1992b. Experimentally induced whirling disease 2. Determination of longevity of the infective triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* by vital staining. *J. Aquat. Anim. Health* 4: 44-47.
- Matos, E., Tajdari, J. & Azevedo, C. 2005. Ultrastructural Studies of *Henneguya rhamdia* n. sp. (Myxozoa) a Parasite from the Amazon Teleost Fish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 52(6): 532-537.
- Morris, D.J. & Adams, A. 2005. Transmission of freshwater myxozoans during the asexual propagation of invertebrate host. *Int. J. parasitol.* 36: 371-377
- Pote, L.M., Hanson, L.A. & Shivaji, R. 2000. Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya* n. sp. (Myxozoa; myxosporea). *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 230-240.

- Pulkkinen, K. 1994. Haukimadon (*Tripanophorus crassus* Forel) esiintyminen kalaisännissä kolmella alueella Suur-Saimaalla vuosina 1991-1993. Pro gradu -työ, 73 s., Jyväskylän yliopisto, biologian laitos.
- Putz, R.E. & Hoffman, G.L. 1966. Earliest susceptible age of rainbow trout to whirling disease. *The progressive Fish-Culturist* 28: 82.
- Rose, J.D., Marrs, G.S., Lewis, C. & Schisler, G. 2000. Whirling disease behavior and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 107-118.
- Steinbach Elwell, L.C., Kerans, B.L., Rasmussen, C. & Winton, J.R. 2006. Interactions among two strains of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) and *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa). *Diseases of the Aquatic Organisms* 68: 131-139.
- Steinbach Elwell, L.C., Kerans, B.L. & Zickovich, J. 2009a. Host-parasite interactions and competition between tubificid species in a benthic community. *Freshwater biology* 54: 1616-1628.
- Steinbach Elwell, L.C., Stomberg, K.E., Ryce, E.K.N. & Bartholomew, J.L. 2009b. Whirling disease in the United States: A Summary of Progress in Research and Management 2009. 1-61
- Stevens, R., Kerans, B.L. Lemmon, J.C. & Rasmussen, C. 2001. The Effects of *Myxobolus cerebralis* myxospore dose on triactinomyxon production and biology of *Tubifex tubifex* from two geographic regions. *Journal of Parasitology* 87: 315-321.
- Stolck, A. 1899. Actinomyxidies, nouveau groupe de Mesozoaires parent des myxosporidies. *Bull. Intl. Acad. Sci. Bohem.* 22: 1-12.
- Taylor, R.L., & Lott, M. 1978. Transmission of salmonid whirling disease by birds fed trout infected with *Myxosoma cerebralis*. *Journal of Protozoology* 25:105-106.
- Timm, T. 1999. A Guide to the Estonian Annelida. Estonian academy Publisher.
- Wagner, E.J., Smith, M., Arndt, R. & Robert, D.W. 2003. Physical and chemical effects on viability of the *Myxobolus cerebralis* triactinomyxon. *Dis. Aquat. Org.* 53: 133-142.
- Xiao, D. & Desser, S.S. 1998. The oligochaetes and their actinosporean parasites in Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario. *J. Parasitol.* 84: 1020-1026.
- Yokoyama, H., Ogawa, K. & Wakabayashi, H. 1991. A new collection method of actinosporeans. A probable infective stage of myxosporeans to fishes from tubificids and experimental infection of goldfish with actinosporean, *Raabeia* sp. *Fish pathol.* 26: 133-138.
- Yokoyama, H., Ogawa, K. & Wakabayashi, H. 1993. Some biological characteristics of actinosporeans from oligochaete *Branchiuru sowerbyi*. *Dis. Aquatic. Org.* 17: 223-228.
- Yokoyama, H. & Urawa, S. 1997. Fluorescent labelling of actinospores for determining the portals of entry into fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 30: 165-169.
- Özer, A. & Wootten, R. 2002a. Biological characteristics of some actinosporeans. *J. Nat. Hist.* 36: 2199-2209.
- Özer, A., Wootten, R. & Shinn, A.P. 2002b. Infection prevalence, seasonality and host specificity of actinosporean types (Myxozoa) in an atlantic salmon fish farm located in Northern Scotland. *Folia Parasitologica* 49: 263-268.
- Wolf, K. & Markiw, M. 1984. Biology contravenes taxonomy in the myxozoan: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225: 1449-1452.