Osaka University Knowledge Archive

Title	Role of symbiotic bacteria on life history traits of freshwater crustacean, Daphnia magna
Author(s)	Peerakietkhajorn, Saranya
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/54011
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

Form 3

Abstract of Thesis

Name (Saranya Peerakietkhajorn)	
Title	Role of symbiotic bacteria on life history traits of freshwater crustacean, *Daphnia magna* (淡水甲殻類オオミジンコの生活史形質に共生細菌が果たす役割)

The crustacean zooplankton *Daphnia* is a primary consumer and functions as a keystone species to maintain equilibrium of a freshwater ecosystem. Therefore, changes in the life history traits of *D. magna* such as population size and longevity cause great impacts on the ecosystem. These ecologically important traits are known to be affected by physical factors such as pH, temperature and photoperiod. Symbiosis, a biotic factor showing the interaction between different biological species, affects the life history traits of many animal species. In *Daphnia*, a metagenomic study revealed the profiles of the symbionts (Qi *et al.*, 2009). However, studies concerning symbiosis in zooplankton, including *Daphnia,* are still limited and the direct functional relationship between *Daphnia* and bacterial symbionts is unknown. Here, I aim to clarify the role of symbiotic bacteria on *Daphnia*'s life history traits.

To study the role of symbiotic bacteria in population size and longevity of *Daphnia*, the removal of the coexisting bacteria in *Daphnia* was necessary. By disinfection of the *Daphnia* embryos with glutaraldehyde, aposymbiotic *Daphnia* were prepared and cultured under bacteria-free conditions. The success of the removal of bacteria from the *Daphnia* was monitored by quantitative polymerase chain reaction for bacterial 16S rRNA gene.We first observed that the population of aposymbiotic *Daphnia* was reduced 10-folds compared to that of the symbiotic *Daphnia*. More importantly, the re-infection of *Daphnia* with symbiotic bacteria caused the aposymbiotic *Daphnia* to regain bacteria and increased their fecundity to the level of the control *Daphnia*, suggesting that symbiotic bacteria regulate *Daphnia* fecundity. We then observed that the mean longevity was not significantly different between aposymbiotic and symbiotic *Daphnia*. Finally, in order to identify the species of symbiotic bacteria in the re-infected and control Daphnia cultures, the 16S rRNA genes of bacteria in both types of *Daphnia* were sequenced. Interestingly, this revealed that 50% of the sequences in both types of Daphnia cultures belonged to the *Limnohabitans* sp. of the *Betaproteobacteria* class, which is known as a major bacterioplankton that lives in global freshwater ecosystems.

To investigate the missing link between *D. magna* and its dominant bacterial symbiont *Limnohabitans*, aposymbiotic juvenile *Daphnia* were prepared and exposed to four *Limnohabitans* sp.—*Limnohabitans* strains DM1 (V. Kasalicky, unpublished), 2KL-3, 2KL-7 (Kasalicky *et al.,* 2013), and *Limnohabitans planktonicus* strain II-D5 (Kasalicky *et al.,* 2010) – all previously found in *D. magna* digestive tract or culture. The re-infected *Daphnia* were cultured until they produced the first clutch of juveniles, and the viability of the juveniles was observed. The *Limnohabitans* DM1 strain and *L. planktonicus* II-D5 strain successfully re-infected *Daphnia* through single exposure at the first instar juvenile stage. In contrast to aposymbiotic *Daphnia*, which produced non-viable juveniles, the re-infected *Daphnia* produced viable juveniles and exhibited increased fecundity to levels of that of the control *Daphnia*. The *Daphnia* re-infected with *Limnohabitans* 2KL-7 and 2KL-3 strains could not recover fecundity even after multiple exposures to these strains during culture. This study shows the functional evidence demonstrating that a single type of *Limnohabitans* bacterium regulates fecundity of *Daphnia* through symbiosis.

Here, a method for preparation of aposymbiotic *Daphnia* was established, which allowed me to analyze the role of symbionts on *Daphnia*'s life history traits. The results revealed that bacterial symbionts not only enhance population size of *Daphnia* but also that a dominant symbiont, *Limnohabitans*, competently regulates the population of *Daphnia* by enhancing the production of viable juvenile *Daphnia*. *Limnohabitans* sp. and *Daphnia* had previously been treated as separate functional units in aquatic food webs that contribute to carbon transfer to higher trophic levels. This study may provide us new insight that there is a novel symbiotic relationship between bacterioplankton and zooplankton for driving trophic cascade in freshwater ecosystems

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（ Saranya Peerakietkhajorn ）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査	教授　渡邉 肇
	副 査	教授　福井 希一
	副 査	教授　村中 俊哉
	副 査	
	副 査	
	副 査	
	副 査	

論文審査の結果の要旨

本論文は、生態系において重要な位置を占める動物プランクトンの 1 種であるオオミジンコ(*Daphnia magna*)を用いて、共生菌が個体群動態におよぼす影響に関する研究をまとめたものであり、緒言、総括を含む４章から構成される。

緒言となる第１章では、本研究の背景と目的、およびその意義について記述している。

第２章では、まずオオミジンコに共生する細菌の集団についてゲノム解析からその種類と分布を明らかにし、主要な共生細菌として Limnohabitans などを同定している。また同時に、オオミジンコを無菌化する手法を開発し共生細菌の有無による個体群動態におよぼす影響を解析している。その結果、無菌化したオオミジンコでは産仔数が大幅に減少し個体群としての維持が困難になることを明らかにしている。

第３章では、同定した Limnohabitans を *in vitro* で培養したのちに、無菌化したオオミジンコに接種し、その影響について解析している。その結果、*Limnohabitans planktonicus* II-D5 および DM5 を接種した場合に産仔数が回復することを明らかにした。またその他の系統の共生菌を接種しても産仔数が回復しない場合があることを明らかにした。

第４章の総括では、これら得られた知見を総括し、今後の展望について総括している。

以上のように、本論文では、生態系を構成する上で重要な位置を占める動物プランクトンにおける共生菌が、動物プランクトン個体群動態において必須であることを明らかにしている。この研究は、環境水中の細菌が動物プランクトンの増殖に必須であり、生態系における物質のフラックスを考える上でも重要な位置づけとなることを始めて示したものである。また生態系を構成する種々の生物の中で、一次消費者である動物プランクトンは重要な位置を占めていることから、動物プランクトンの個体群動態に影響を与える要因を明らかにすることは、環境保全や環境影響評価などにおいても非常に重要であり、本論文の意義は大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。