

# Rapid Adjustments in Thermal Tolerance and the Metabolome to Daily Environmental Changes – A Field Study on the Arctic Seed Bug *Nysius groenlandicus*

NATASJA KROG NOER<sup>1</sup> \*, MATHIAS HAMANN SØRENSEN<sup>1</sup>, HERVE COLINET<sup>2</sup>, DAVID RENAULT<sup>2,3</sup>, SIMON BAHRNDORFF<sup>1</sup>† AND TØRSTEN NYGAARD KRISTENSEN<sup>1</sup>†

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND BIOSCIENCE, AALBORG UNIVERSITY, AALBORG, DENMARK,  
<sup>2</sup> UMR 6553, CNRS, ECOSYSTEMES, BIODIVERSITÉ, ÉVOLUTION, UNIVERSITY OF RENNES 1, RENNES, FRANCE,  
<sup>3</sup> INSTITUT UNIVERSITAIRE DE FRANCE, PARIS, FRANCE

*Nysius groenlandicus* - Media - Artportalen







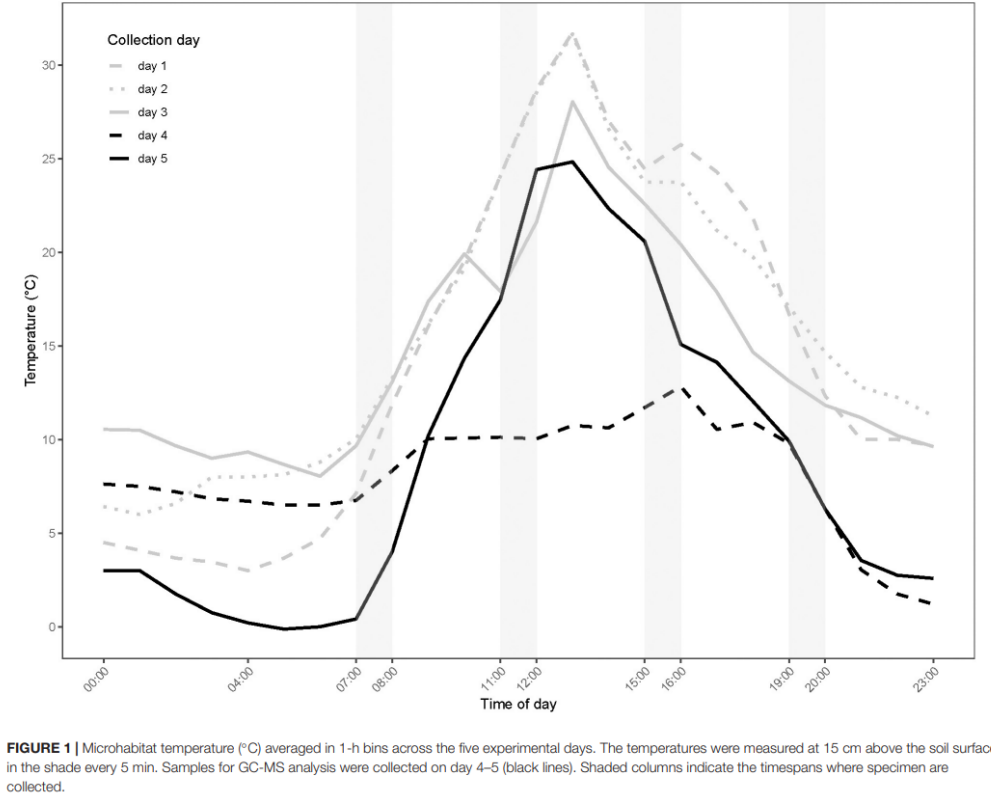
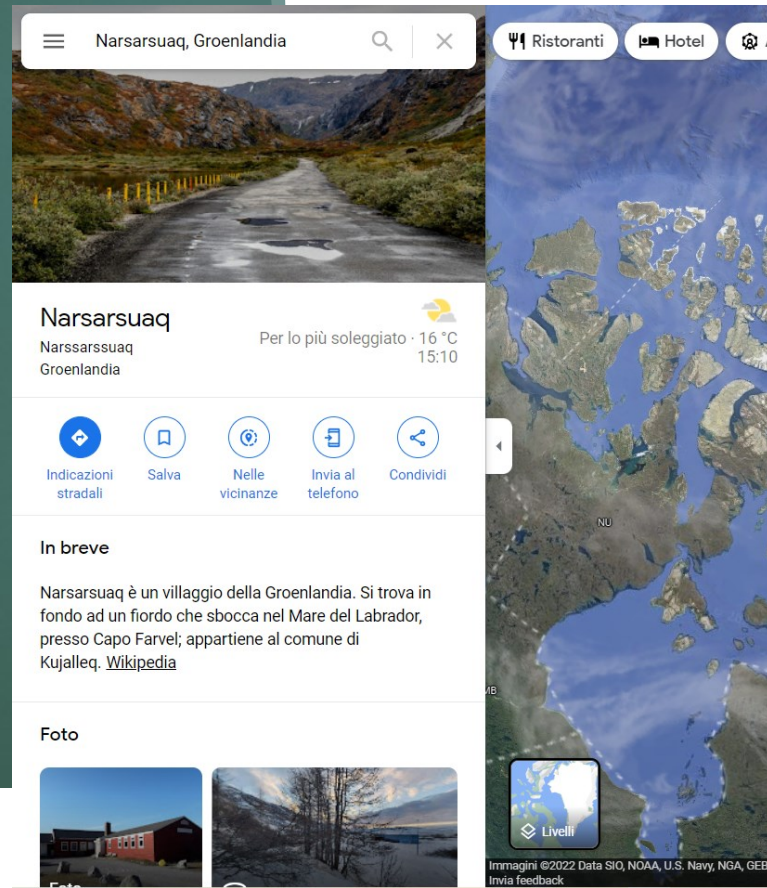
# SCOPO

- ▶ Determinare come e in che misura ci possa essere una differenza nella risposta agli stress abiotici in funzione dell'andamento ambientale della variabile temperatura.
- ▶ Misurare l'hardening response, dimostrata in letteratura per animali modello (*Drosophila melanogaster*) ma solo in condizioni di laboratorio.

# Contesto

Ordine: Hemiptera

Tipico del contesto subartico dove si ha tipicamente un grosso volano termico.





# WORK FLOW

5 giorni  
4 time point

Raccolta  
campioni

- Misura temperatura microhabitat ogni 15m
- (8am / 12 am / 4pm / 8pm)
- Baker individuale 4ml / ombra
- Determinazione del sesso «by eye»

30'-45' dalla  
cattura

20♀  
20♂  
per assay

Determinazion  
e HKDT

Determinazion  
e CCR

Per time  
point

- 8 ripetute
- 5 ♀

Metabolic  
fingerprint

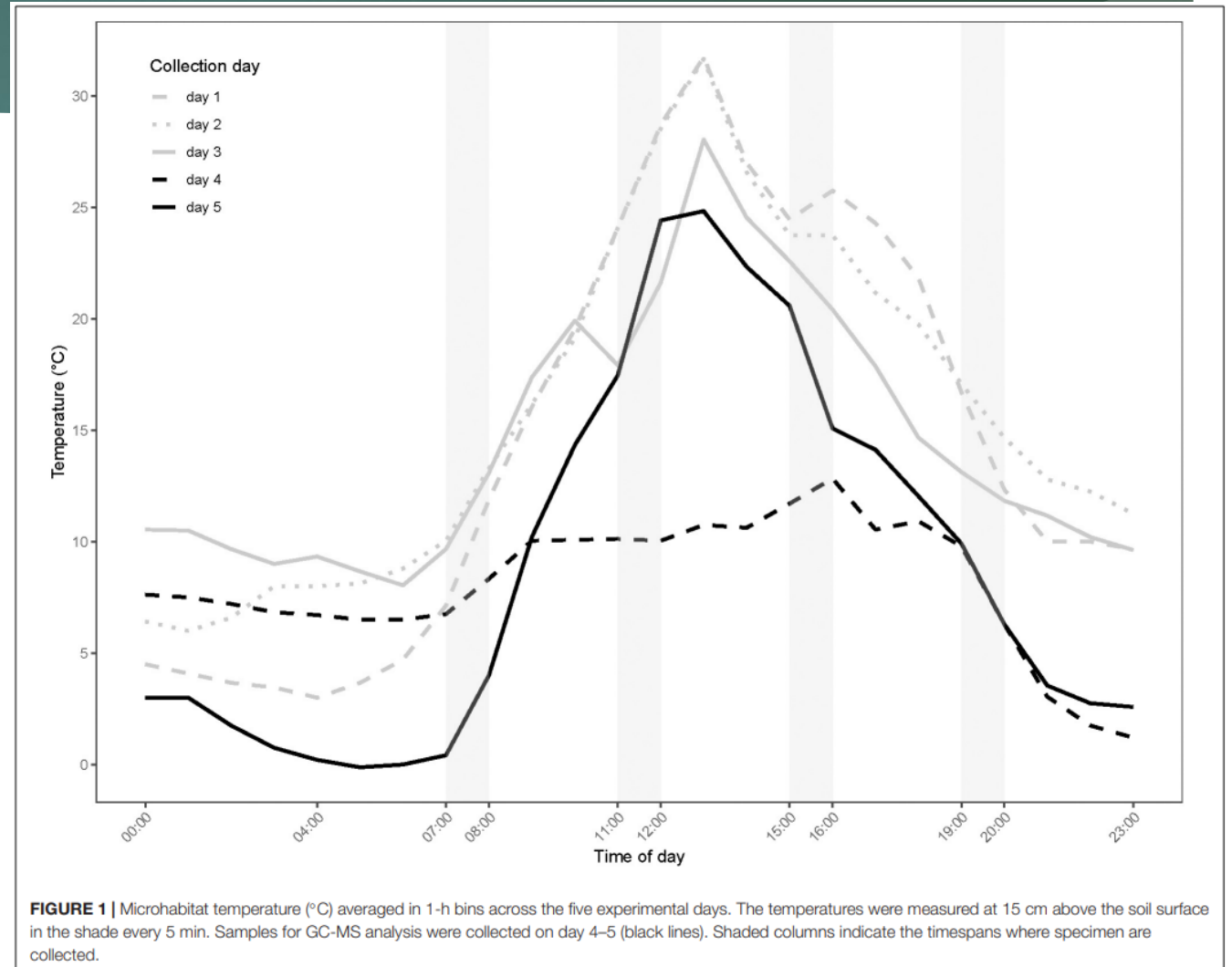
Direttamente trasferiti in RNAlater e  
storage -20°C (1week)  
=> Trasferimento al laboratorio epr le  
analisi stored -80°C

# MISURA DELLA TEMPERATURA

Termometro elettrico a termocoppia

Modus operandi:

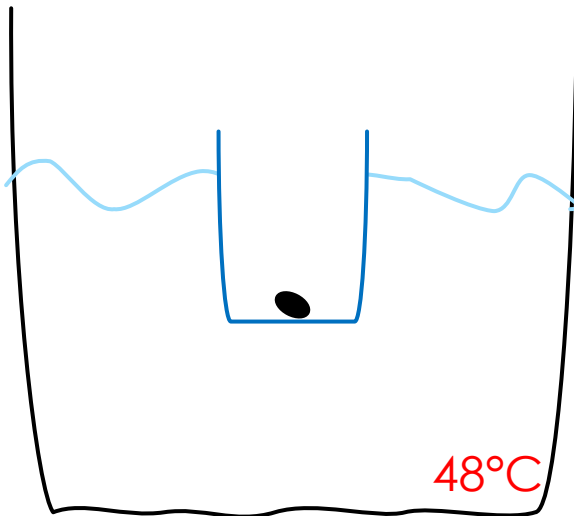
- **15cm** da terra
- Nell'ora precedente i 4 time point di cattura ogni **5'**
- Ogni **15'** al di fuori di questi periodi



# HKDT ASSAY (heat knock down time)

Misura del tempo di raggiungimento del coma o morte indotti dal calore

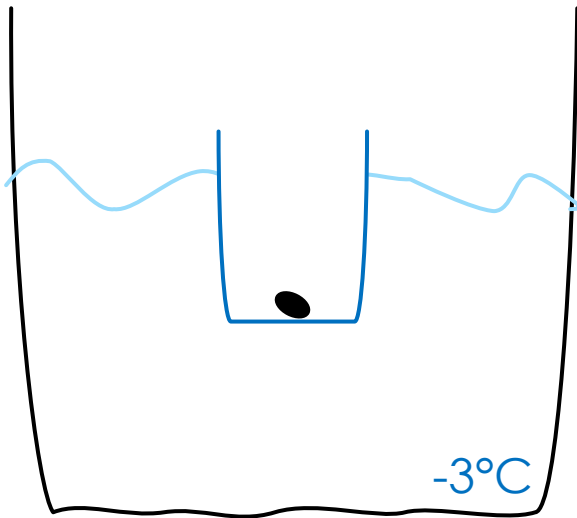
Misura diretta di tolleranza ad alte temperature. Misura di resistenza allo stress.



Temperatura frutto delle esperienze pregresse e di un lavoro preliminare. A queste temperature, infatti, si è visto che *N. groenlandicus* entra in coma nell'arco di 20'-40' a queste condizioni.

# CCR chill coma recovery

misura della temperatura alla quale si riacquista movimento dopo un coma indotto dall'esposizione a basse temperature



in letteratura questa temperatura induce il coma in pochi minuti e con rate di sopravvivenza totale una volta tornati a temperature ottimali.

⇒ Dopo l'immersione e il raggiungimento del coma la temperatura viene aumentata alla velocità di  $+0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

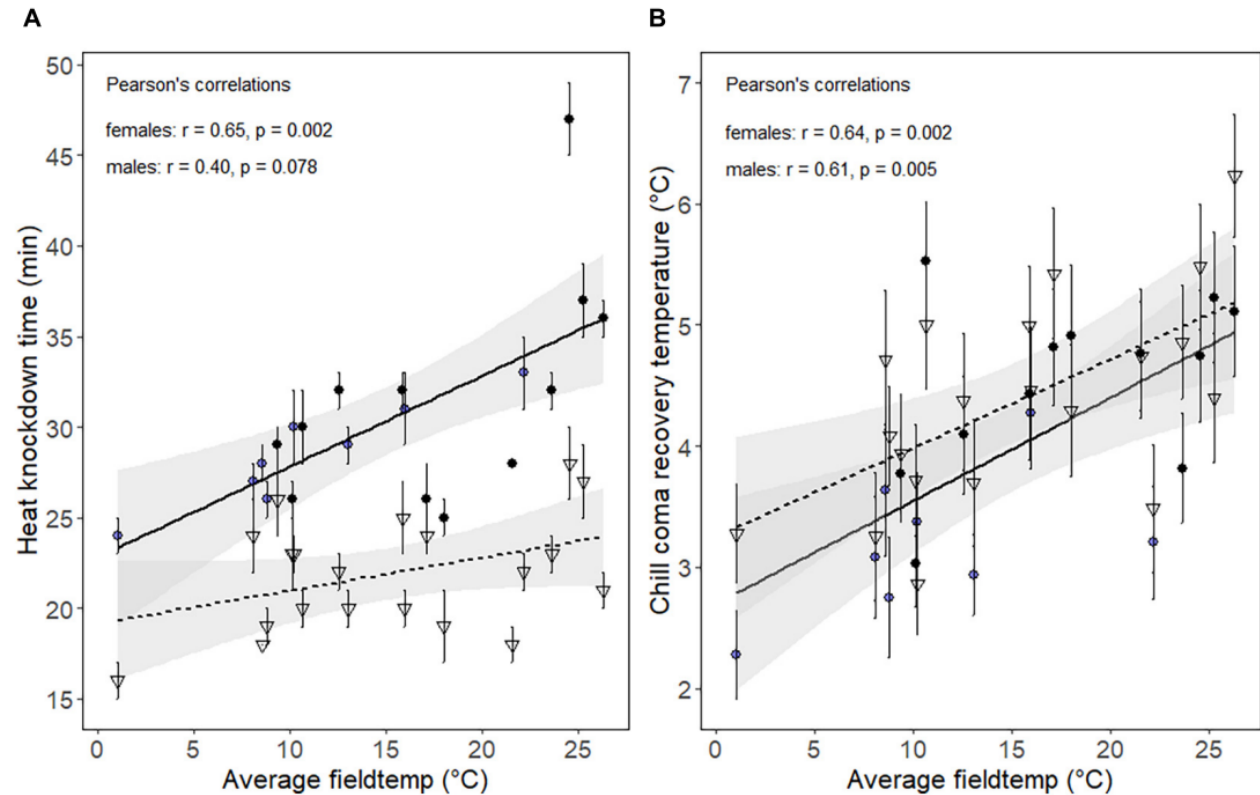
Alla riacquisizione del movimento si misura la temperatura per ogni individuo

# RESULTS: Tolleranza termica

Correlazione tra HKDT(A)/CCR(B) e temperatura media dell'ora precedente

- (A) Significativa per le femmine ma non per i maschi
- (B) la Tr è significativamente e positivamente correlata alla temperatura per ambo i sessi

I risultati indicano la presenza di un trade-off tra la tolleranza al caldo e quella al freddo.



**FIGURE 2** | Scatter plot showing the mean (A) heat knockdown time in minutes, and (B) chill coma recovery temperature ( $T_{\text{recovery}}$ ) of females (circles) and males (triangles), as a function of the average microhabitat temperature 1 h prior to assay start. At eight sampling times, females were collected for metabolomic fingerprints simultaneously with individuals used for the thermal assays (blue circles). Black points are data points with no metabolomic fingerprints associated. Solid (female) and dotted (male) lines represent regressions between field temperature and thermal tolerances. Bars are standard errors of the mean.

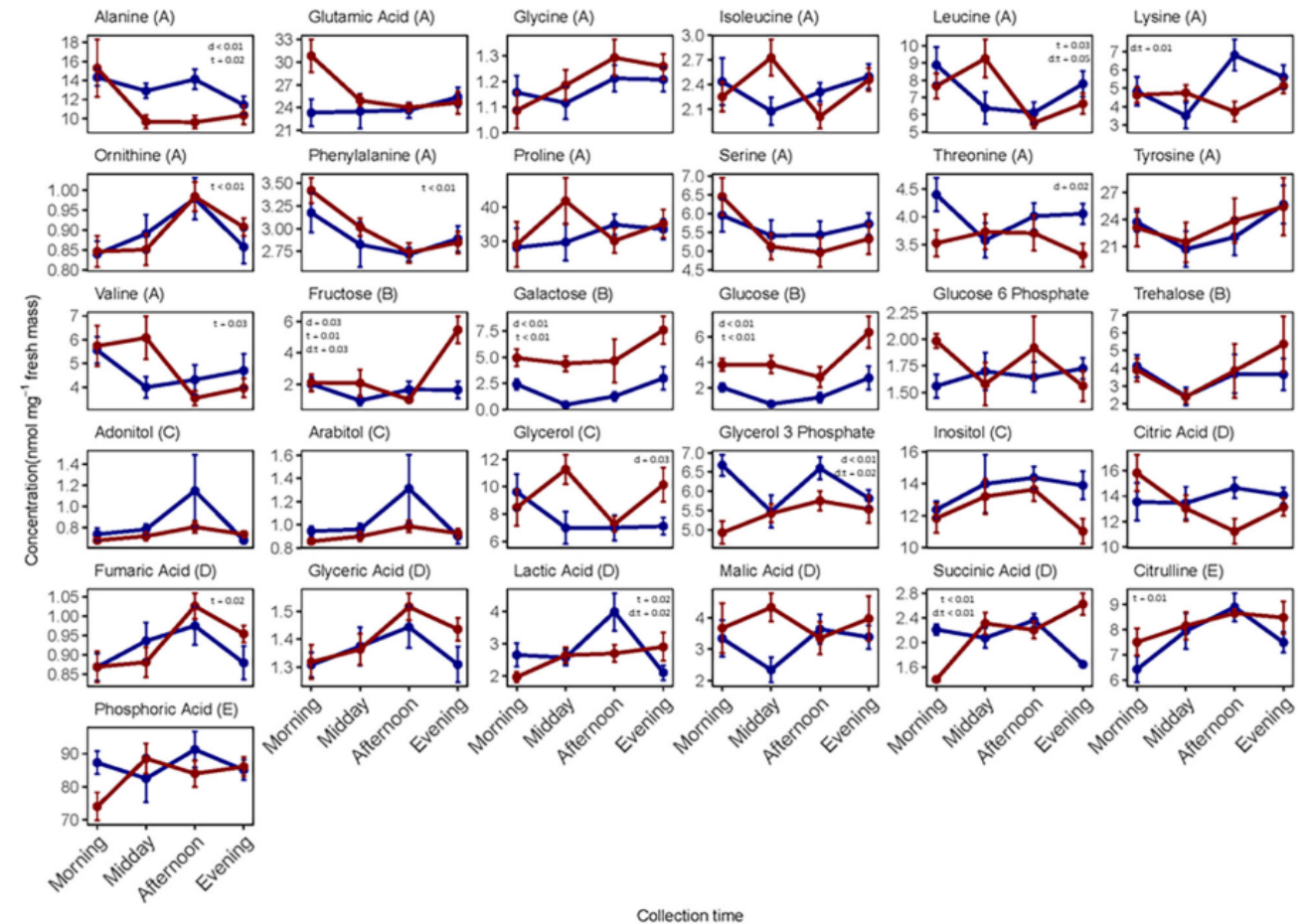


# RESULTS: Metabolic profiling

Whole body extract => analisi con GC-MS (gas cromatografia-spettrometria di massa)

## 33 metaboliti identificati

- 13 aa liberi
- 5 zuccheri
- 6 polialcoli
- 6 intermedi metabolici
- 3 altre molecole



**FIGURE 3** | Individual metabolite concentrations (nmol mg<sup>-1</sup> dry mass) measured in whole-body extracts of female *N. groenlandicus* collected from the field at four consecutive time points (morning, midday, afternoon, and evening) during day 4 (blue) and day 5 (red). Each point represents mean concentration ( $n = 8$ ) and bars are standard errors of the mean. Differences between concentrations (log-transformed) and collection days (d), collection times (t), and the interaction between day and time (d:t) were investigated using 2-way ANOVAs and significance  $p$ -values are shown on each plot if significant. The metabolites are classified from A to E in the header according to functional group; A, amino acids; B, sugars; C, polyols; D, metabolic intermediates; and E, other metabolites.

## RESULTS: Metabolic profiling

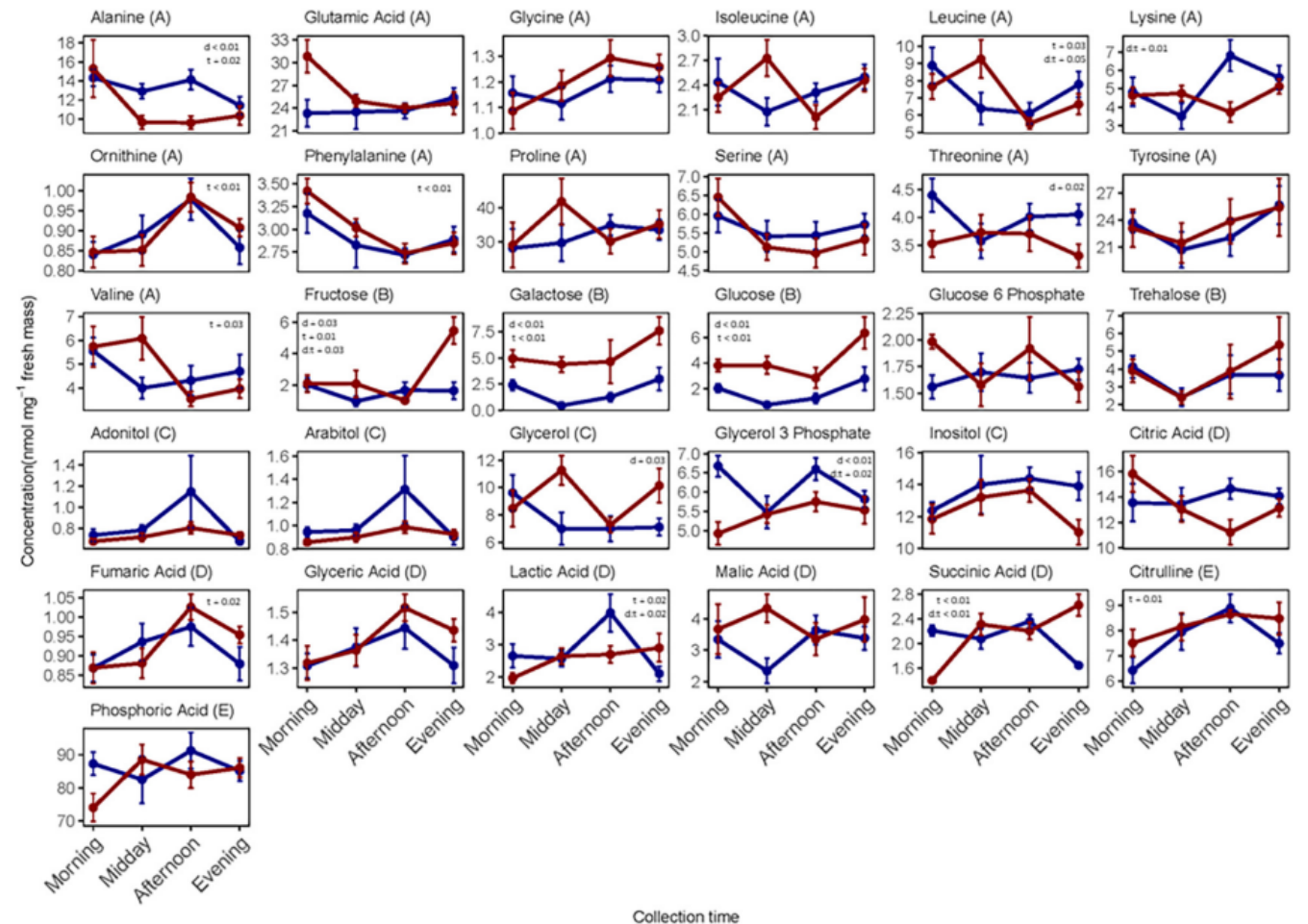
### EFFETTO TIME POINT

I metaboliti che avevano concentrazione correlata con il time point erano:

- 6 per entrambi i giorni
- 8 per il 5° giorno
- 7 per il 4° giorno

Questo supporta l'ipotesi che le condizioni del microambiente hanno un forte impatto sui cambi fisiologici degli adulti di *N. groenlandicus*.

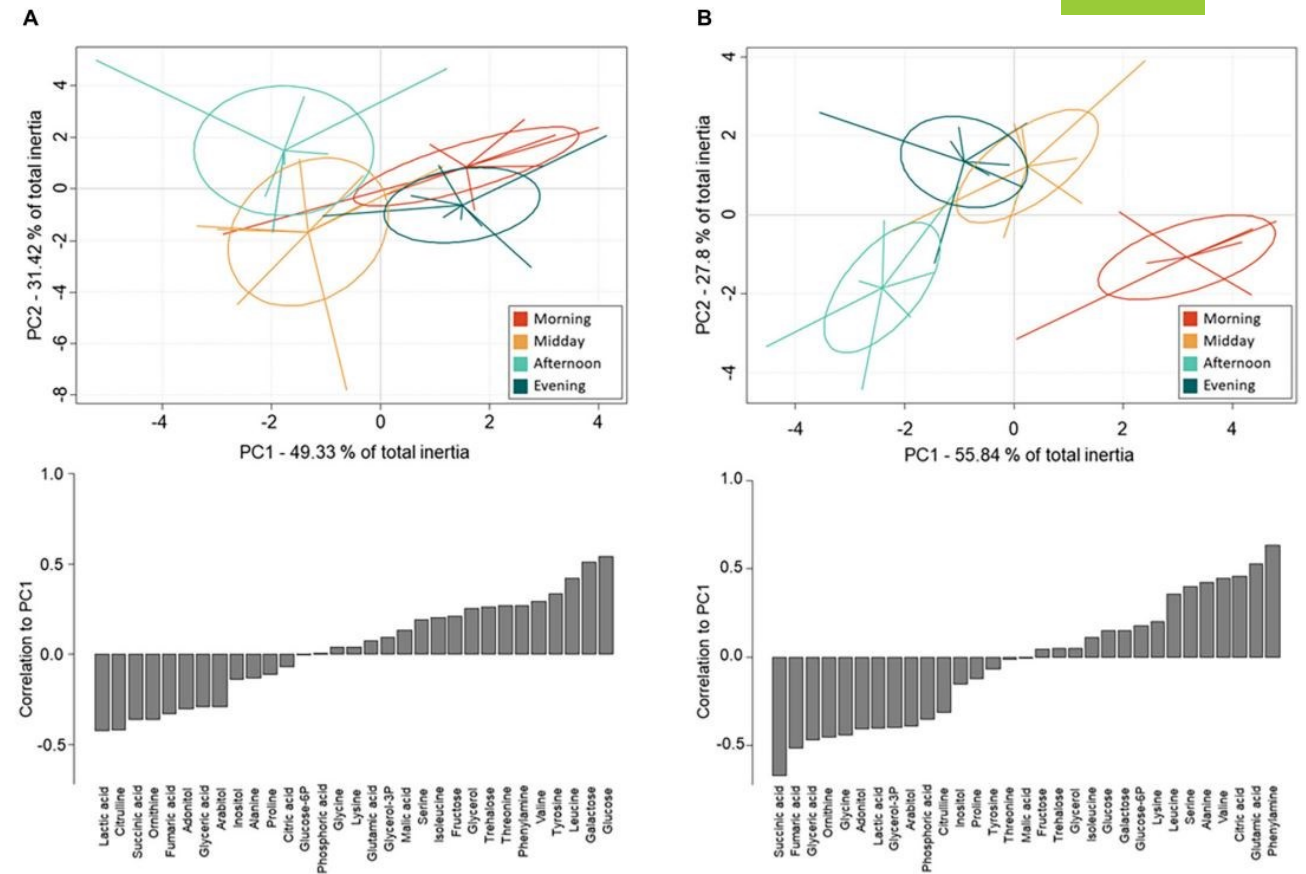
Suggerisce in oltre che le variazioni diurne osservate nell'impronta metabolica non possono essere spiegati dai motivi di regolazione circadiani da soli, perchè si dovrebbero vedere pattern simili nei due giorni



**FIGURE 3 |** Individual metabolite concentrations (nmol mg<sup>-1</sup> dry mass) measured in whole-body extracts of female *N. groenlandicus* collected from the field at four consecutive time points (morning, midday, afternoon, and evening) during day 4 (blue) and day 5 (red). Each point represent mean concentration ( $n = 8$ ) and bars are standard errors of the mean. Differences between concentrations (log-transformed) and collection days (d), collection times (t), and the interaction between day and time (d:t) was investigated using 2-way ANOVAs and significance  $p$ -values are shown on each plot if significant. The metabolites are classified from A to E in the header according to functional group; A, amino acids; B, sugars; C, polyols; D, metabolic intermediates; and E, other metabolites.

## RESULTS: Metabolic profiling PCA

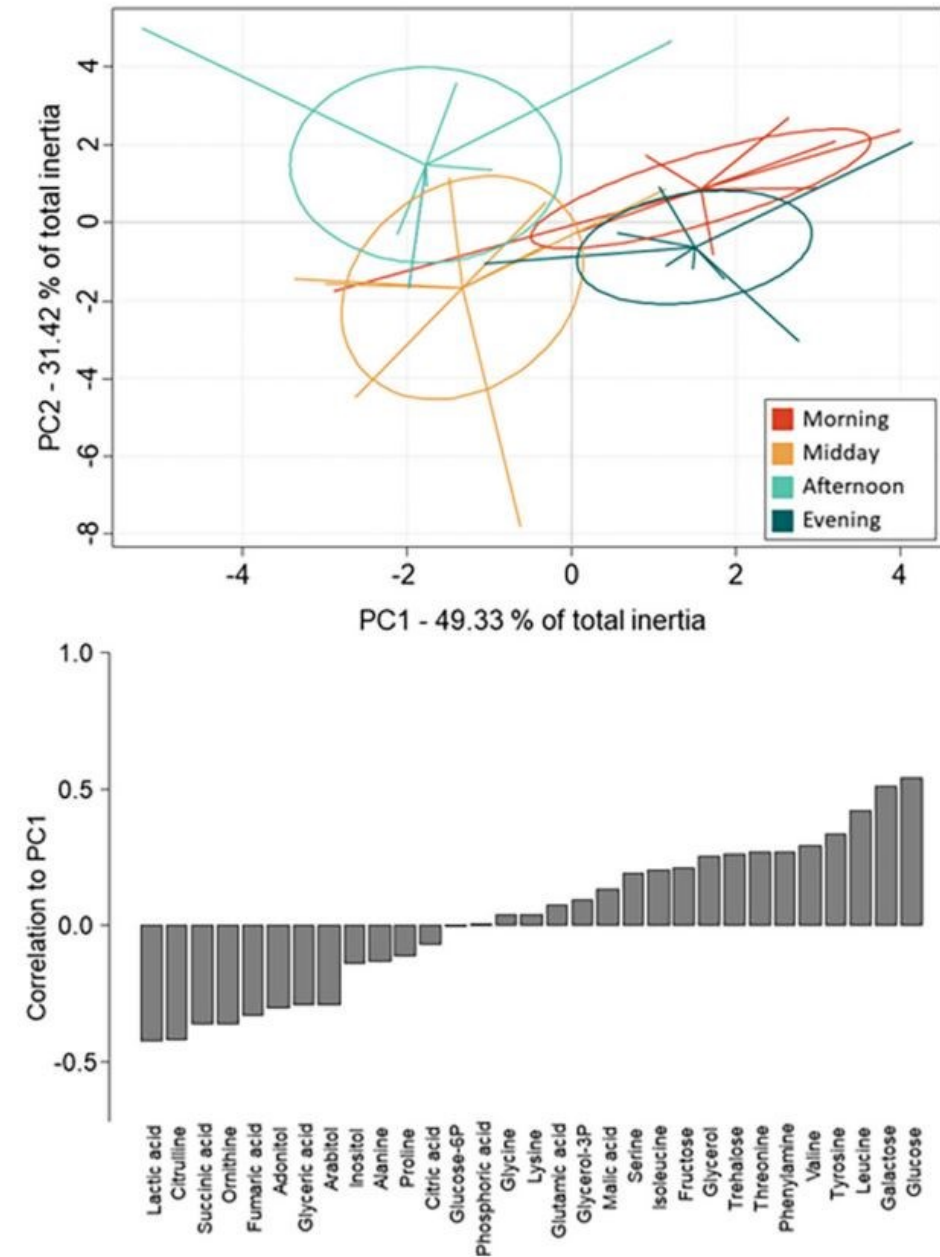
- Tutte le classi temporali hanno mostrato una netta separazione, mostrando che l'impronta metabolica si differenzia tra i diversi time point.
- Separazione maggiore per il giorno 5° piuttosto che per il 4°



**FIGURE 4** | Between-class Principal Component Analyses (top) and metabolite correlations to PC1 (bottom) based on GC-MS quantification of metabolites from whole-body extracts of female *N. groenlandicus* sampled in the field at four consecutive sampling time points (8:00 am, 12:00 pm, 4:00 pm, 8:00 pm) on **(A)** the thermally stable sampling day (day 4) and **(B)** the thermally variable sampling day (day 5). Lines represent individual sample positions relative to centroids ( $n = 8$ ).



A

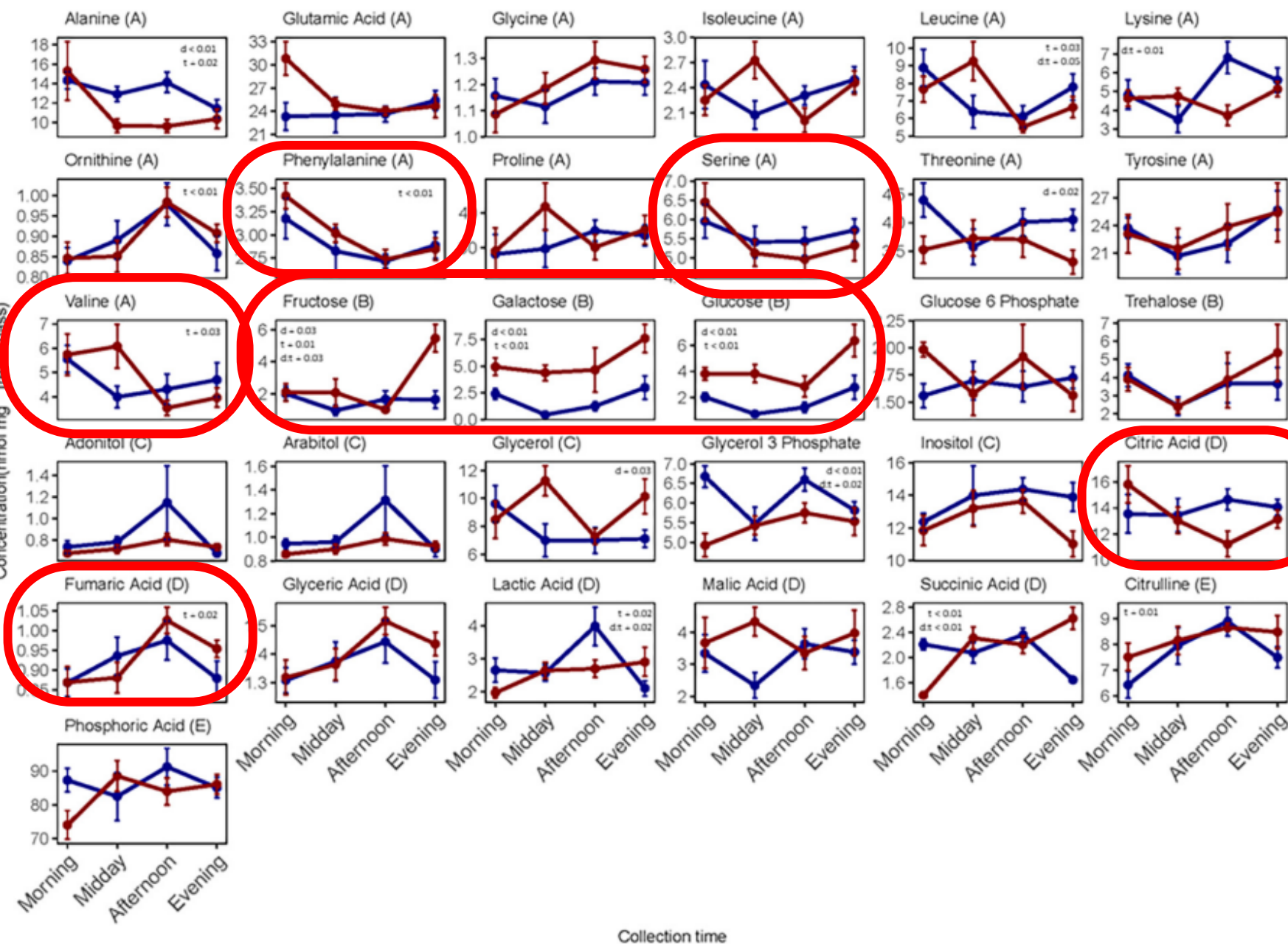


# Giorno 4: METABOLIC FINGERPRINT

I cambiamenti misurati nelle concentrazioni di metaboliti in questo giorno sono indipendenti dalla temperatura e riflettono piuttosto aggiustamenti di tipo circadiani nel metabolismo energetico.

Ipotesi è supportata dal modello di raggruppamento dei profili metabolomici degli individui raccolti nei quattro diversi momenti del giorno 4.

I profili metabolomici al **mattino e alla sera** sono più simili e separati da quelli degli individui raccolti a **mezzogiorno e al pomeriggio**.

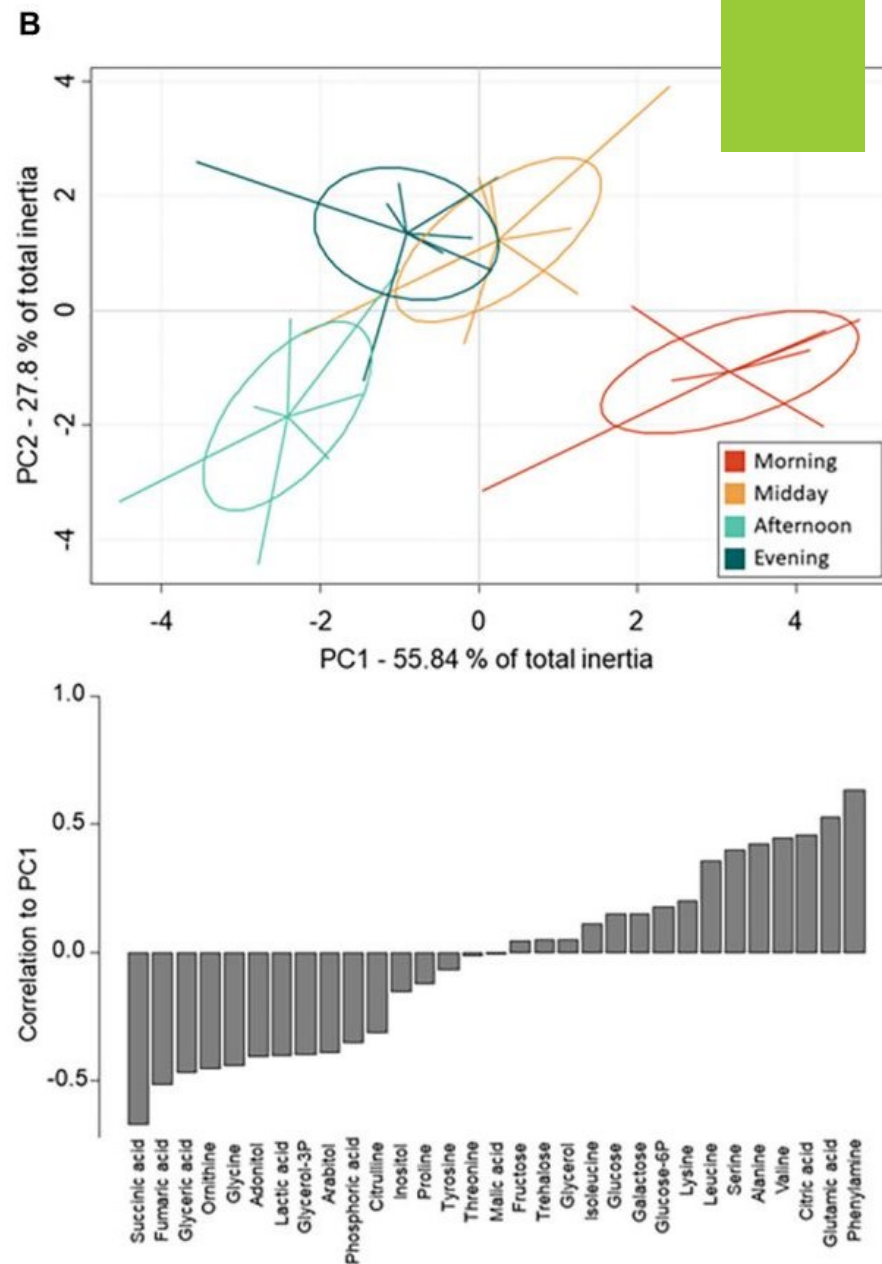


Gli zuccheri (**glucosio, fruttosio, galattosio**), alcuni intermedi metabolici (**acido citrico e fumarico**) e una gamma di aminoacidi liberi (**fenilalanina, valina, serina, glutammina e tirosina**), essendi tutti substrati importanti per la glicolisi e il ciclo di Krebs, variano in schemi ritmici sia nel giorno 4 che nel giorno 5.

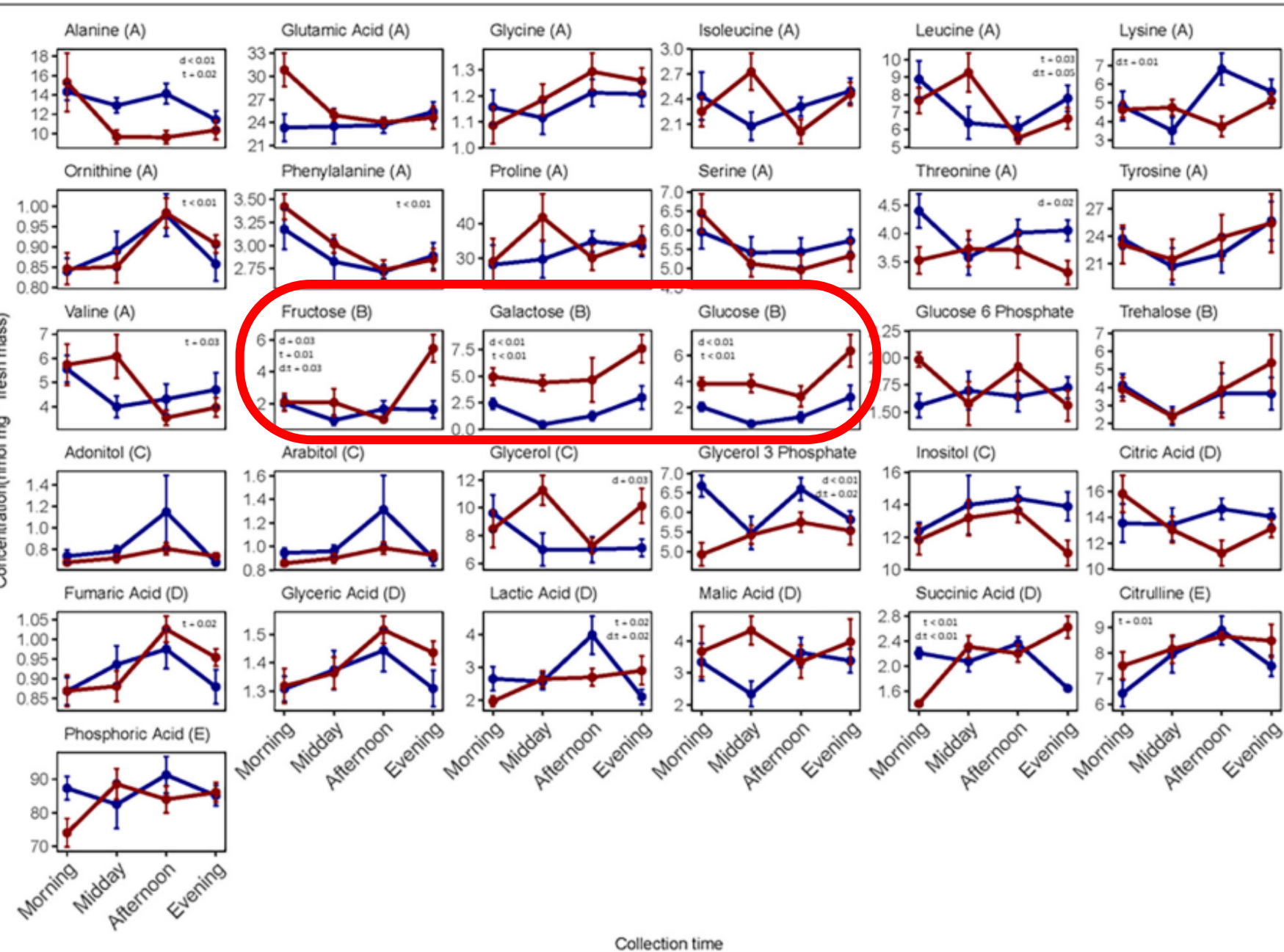
Questi schemi potrebbero costituire meccanismi dell'orologio circadiano che sono regolati indipendentemente da temperatura, umidità e altri fattori abiotici variabili come si vede, ad esempio, in *D. melanogaster*.

# Giorno 5: METABOLIC FINGERPRINT

► lo schema di separazione è stato nettamente diverso da quello riportato per il giorno 4. I gruppi che si separano maggiormente sono quelli degli individui raccolti **al mattino e al pomeriggio**, rappresentando i punti temporali con le temperature più basse e più alte del giorno 5.







Per tutta questa giornata, gli zuccheri **fruttosio**, **glucosio** e **galattosio**, sono presenti in quantità maggiori rispetto al giorno 4 anche di 2-3 volte la sera negli individui campionati il giorno 5, nonostante la temperatura fosse la stessa nei due time point.

# CONCLUSIONI & CRITICITA'

- **Tolleranza al freddo:** adattamento a pressioni selettive non legate al sesso
  - **Tolleranza al caldo:** adattamento a pressioni selettive legate al genere per chiudere il ciclo vitale
  - Avviene un **trade off** tra e due capacità
  - Evidenze di un **impronta metabolica marcata associata alla caratteristica di tolleranza**
- Oscillazioni di osmoliti non esclusivamente legata alla regolaizione termica
    - Alimentazione differenziale
    - Processamento dell'alimento
    - Attività temperatura dipendente

The background image shows a blurred view of a building with large white columns. A bright, warm light source, likely the sun, is visible in the upper right, creating a lens flare effect. In the foreground, a blue and red container is partially visible. A large, semi-transparent teal circle is overlaid on the left side of the image, containing the text.

GRAZIE PER  
L'ATTENZIONE  
E  
IN BOCCA AL  
LUPO PER GLI  
ESAMI A TUTTI