



De Novo Transcriptome Analysis Reveals Potential Thermal Adaptation Mechanisms in the Cicada *Hyalessa fuscata*

Animals, 2021

Hoa Quynh Nguyen, Yuseob Kim and Yikweon Jang



Indice

- Area di studio
- *Hyalessa maculaticollis*
- *H. maculaticollis* e stress termico
- Osservazioni e ipotesi
- Assemblaggio *de novo* del trascrittoma
- Campionamento
- Metodi: esperimenti termici
- Metodi: assemblaggio trascrittoma
- Risultati: stress termico
- Risultati: stress termico acuto
- Risultati: torpore termico
- Conclusioni





Area di studio

- **Seoul** metropolitana
- Effetto **isola di calore urbana** (Urban Heat Islands - UHI)
- Nuclei urbani più caldi rispetto zone circostanti

- Isole di calore più calde (high-UHI)
- Isole di calore più fresche (low-UHI)

- **3 aree** di campionamento:
 - High-UHI - Seocho
 - Low-UHI - Nowon
 - Suburbana - Jookyo

! Correlazione T ambientale - urbanizzazione

Hyalessa maculaticollis

(Motschulsky, 1866)

- Sinonimo: *Hyalessa fuscata* (Distant, 1905)
- Ordine: **Hemiptera**
- Sottordine: Auchenorrhyncha
- Famiglia: **Cicadidae**
- Distribuzione: **NE Asia**
- Dimensioni: 33 - 36 mm in lunghezza
- **Ectotermi - Pecilotermi**
- T corporea dipendente dall'ambiente esterno



H. maculaticollis e stress termico

- T influenza: **attività molecolare**, **velocità reazioni** chimiche e **processi metabolici**, ovodeposizione, distribuzione specie
- **Stress termico**: attivazione meccanismo istantaneo di difesa cellulare

Conseguenze:

- **Proteine da shock termico (Hsp)** - mediano il corretto ripiegamento proteico, riparano le proteine denaturate, si legano alle proteine non ripiegate e degradano le proteine anormali
- **Enzimi antiossidanti** attivati come meccanismo di difesa per eliminare le specie reattive dell'ossigeno (**ROS**)
- **Danno al DNA** e la sua riparazione, alterazione dei meccanismi di rilevamento e trasduzione delle risposte immunitarie intracellulari





Osservazioni e ipotesi

Osservazioni:

- **Popolazione** cicale **espansa** molto negli ultimi decenni
- Densità di popolazione più elevate nelle **aree urbane più calde**

Ipotesi - dopo stress termico nelle high UHI:

- Espressione di **geni** che **umentano tolleranza termica**
- Esempi: geni legati a shock termico, metabolismo energetico, difese antiossidanti, disintossicazione e risposte immunitarie
- Maggiori **cambiamenti del trascrittoma** legati alla resistenza al calore
- Potenziale **adattamento** della specie ai caldi nuclei urbani

Assemblaggio *de novo* del trascrittoma

- **Trascrittoma** (= genoma trascritto)
- Set di tutti gli **RNA trascritti** da un genoma
- **Assemblaggio *de novo*** del trascrittoma
- Metodo di assemblaggio di sequenze *de novo* (dal principio) per creare un trascrittoma **senza l'ausilio di un genoma di riferimento**
- Utile quando non si lavora con organismi modello o di cui il genoma non è disponibile



Campionamento

- **Adulti** di *H. maculaticollis*
- **3 aree** (high-UHI, low-UHI e suburbana)
- Catturati: **27** individui - 9 per ogni area
- Esaminati - 3 individui di ogni area per i 3 esperimenti

Valutazione diverse espressioni geniche a cicale:

1. **Senza riscaldamento**
2. Dopo **stress termico acuto** (10 minuti)
3. Dopo **esposizione al torpore termico**

2 visite per area:

- luglio **2017** - torpore termico e controllo
- agosto **2019** - esposizione continua a 10 minuti di stress termico acuto



Metodi: esperimenti termici

- **T corporee** (controllo): termometro digitale senza contatto
- **T 10 min**: dopo **riscaldamento costante** per 10 minuti
- **T torpore termico**: esposizione al calore fino all'**assenza di movimento fisico**

- **Tessuti del pronoto**: conservati a - 80 °C per preservare l'RNA totale
- **Pronoto**: parte dorsale del primo segmento toracico o protorace



Metodi: assemblaggio trascrittoma

- **Estrazione RNA**
- **Analisi RNA-sequencing**: per quantificare e identificare le molecole di RNA e ottenere il trascrittoma
- Prelevati **3 μ L di RNA** da ciascun campione - materiale di input per la qualificazione della libreria di cDNA

N.B. DNA complementare (cDNA): molecola di DNA prodotta dall'enzima trascrittasi inversa sulla base dell'RNA

Libreria di cDNA: insieme di cloni di cDNA

- **Sequenziamento** delle librerie di cDNA
- Arricchimento dei frammenti tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)
- **Ricostruzione *de novo* dei trascrittomi** dai dati RNA-seq assemblando letture brevi in frammenti più lunghi o geni
- **Determinazione geni coinvolti nel facilitare la tolleranza termica**
- Analisi geni espressi in modo differenziale (Differentially Expressed Genes - DEG)



Risultati: stress termico

T corporee cicale dopo **10 minuti di stress termico acuto**:

- High-UHI: 44.93 ± 1.9 °C
- Low-UHI: 44.37 ± 4.0 °C
- Area suburbana: 43.1 ± 0.6 °C

T corporee cicale in **torpore termico**:

- High-UHI: **47.77 ± 1.5** °C
- Low-UHI 42.37 ± 1.2 °C
- Suburbana 44.03 ± 3.6 °C



Risultati: stress termico acuto

- a. Confronto cicale sottoposte allo stress e gruppo di controllo della stessa area:
 - High e low-UHI: quantità comparabile di geni espressi in modo differenziale
 - Suburbane: pochi DEG
 - High-UHI: geni coinvolti in metabolismo, antiossidanti e disintossicazione hanno mostrato **risposte significativamente sovra-regolate**

- b. Confronto tra cicale sottoposte allo stress:
 - Low-UHI e suburbane: **maggiore sovra-regolazione Hsp** (proteine da shock termico) rispetto a high-UHI
 - Cicale low-UHI e suburbane: **più sensibili al calore e più elevato stress termico** rispetto a high-UHI

Risultati: torpore termico

Cambiamenti notevoli nell'**espressione genica** nelle cicale di **tutte le aree**

- High-UHI: + DEG
- Suburbane: - DEG

a. Confronto tra cicale in torpore termico e stress termico della stessa area:

- **+ geni sovra-regolati**: in particolare per Hsp, metabolismo e disintossicazione

b. Confronto tra cicale in torpore termico:

- High-UHI rispetto a suburbane: **5 Hsp** espresse in modo significativamente diverso e **livelli + elevati di geni** legati a processi antiossidanti, metabolici e di disintossicazione

! Maggiore tolleranza termica delle cicale high-UHI probabilmente associata a maggiore espressione di geni per disintossicazione e metabolismo energetico



Conclusioni

Cicale provenienti da high-UHI rispetto a low-UHI e aree suburbane:

- **Sovra-regolazione** proteine da shock termico **Hsp**
- Aumento espressione **enzimi antiossidanti**
- Aumento espressione **geni del metabolismo energetico**

! Alcuni meccanismi di regolazione genica possano facilitare **migliori risposte termiche**

! **Migliore tolleranza termica** è **vantaggiosa** perché **accelera** il tasso di **sviluppo** degli stadi giovanili e permette lo sfruttamento di **nuove nicchie**



Bibliografia

- Nguyen HQ, Kim Y, Jang Y. De Novo Transcriptome Analysis Reveals Potential Thermal Adaptation Mechanisms in the Cicada *Hyalessa fuscata*. *Animals* (Basel). 2021 Sep 24;11(10):2785. doi: 10.3390/ani11102785
- Venket Raghavan, Louis Kraft, Fantin Mesny, Linda Rigerte, A simple guide to de novo transcriptome assembly and annotation, Briefings in Bioinformatics, Volume 23, Issue 2, March 2022, bbab563, <https://doi.org/10.1093/bib/bbab563>
- <https://www.google.com/maps/place/Seul>
- https://en.wikipedia.org/wiki/De_novo_transcriptome_assembly
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Transcriptome>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Transcriptomics_technologies
- https://online.scuola.zanichelli.it/alt/materiali/biologia/Glossario/C/G_cDNA.htm
- https://it.wikipedia.org/wiki/Libreria_di_DNA_complementare
- https://en.wikipedia.org/wiki/Hyalessa_maculaticollis
- <https://hoppers.speciesfile.org/otus/12061/overview>
- <https://www.gbif.org/occurrence/gallery?q=Hyalessa%20maculaticollis>
- <https://www.inaturalist.org/taxa/359390-Hyalessa-maculaticollis>
- <https://en.wikipedia.org/wiki/RNA-Seq>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction
- https://it.wikipedia.org/wiki/Gene_Ontology



Grazie per l'attenzione

Domande?

