

雷氏萤 *Aquatica leii* 热休克蛋白超基因家族的全基因组鉴定及其在高温胁迫应答中的表达*

余航远^{1**} 汪法能¹ 江 晓¹ 李佳鹏² 曹成全³ 王义平^{2***}

(1. 钱江源国家公园管理局, 衢州 324300; 2. 浙江农林大学, 林业与生物技术学院, 杭州 311300;

3. 乐山师范学院, 生命科学学院, 乐山 614004)

摘 要 【目的】热休克蛋白 (Heat shock protein, Hsp) 在动植物生长发育和胁迫响应中有着重要的作用。然而, 关于雷氏萤 *Aquatica leii* Hsp 超基因家族的鉴定和功能特征的信息较少。本研究旨在鉴定雷氏萤中 Hsp 基因家族及其在高温响应中的表达。【方法】使用生物信息学鉴定雷氏萤 Hsp 超基因家族成员, 并通过转录组分析了 Hsp 在高温胁迫响应中的表达情况。【结果】Hsp 家族包含 45 个 Hsp 成员, 分别是 3 个 Hsp90、19 个 Hsp70、9 个 Hsp60 和 14 个 sHsp 基因。在雷氏萤不同发育阶段的发光器中, 大部分 Hsp 的表达呈现出逐渐降低的趋势。高温胁迫下幼虫转录组分析表明, *AlHsp70-7*、*AlHsp70-8*、*AlsHsp17.44*、*AlsHsp17.49*、*AlsHsp20.77* 和 *AlsHsp29.38* 被温度胁迫所诱导, 随着温度的增加, 表达量也在逐步增加。【结论】在 28 和 32 °C 胁迫下分别有 12 和 13 个 Hsp 基因显著上调, 其在响应高温胁迫应答中可能发挥着重要的作用。这些结果为进一步探索其功能奠定了良好的基础。

关键词 雷氏萤; 生物信息学; 热休克蛋白; 高温胁迫

Genome-wide identification of the *Aquatica leii* heat shock protein and analysis of their expressions in response to high-temperature stress

YU Hang-Yuan^{1**} WANG Fa-Neng¹ JIANG Xiao¹ LI Jia-Peng²
CAO Cheng-Quan³ WANG Yi-Ping^{2***}

(1. Qianjiangyuan National Park Management Bureau, Quzhou 324300, China; 2. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 3. College of Life Sciences, Leshan Normal University, Leshan 614004, China)

Abstract [Aim] To identify the Hsp gene family of *Aquatica leii* and quantify its expression in response to high temperatures. [Methods] The Hsp supergene family of *A. leii* was identified using bioinformatics, and its expression in response to high temperature stress was analyzed using transcriptome analysis. [Results] The AlHsp family contains 45 Hsp family members, including 3 Hsp90, 19 Hsp70, 9 Hsp60 and 14 sHsp genes. The number of Hsp genes expressed gradually decreased in the luminescent organs of different developmental stages. Transcriptome analysis of larvae under high temperature stress showed that *AlHsp70-7*, *AlHsp70-8*, *AlsHsp17.44*, *AlsHsp17.49*, *AlsHsp20.77* and *AlsHsp29.38*, were induced by temperature stress, and that expression progressively increased with increasing temperature. [Conclusion] At 28 and 32 °C, the 12 and 13 Hsp genes were significantly upregulated, which suggests that these play an important role in the response to high temperature stress. These results lay a solid foundation for further investigation of the function of the Hsp gene family.

Key words *Aquatica leii*; bioinformatics; heat shock protein; high-temperature stress

*资助项目 Supported projects: 钱江源园区萤火虫生物多样性调查与生境修复项目 (QZNHKH2025-12); 2025 年浙江省大学生科技创新活动计划 (2025R412C062)

**第一作者 First author, E-mail: 214031506@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wyp@zafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2025-11-12; 接受日期 Accepted: 2026-05-08

近年来,全球气候系统正在经历重大变化,工业化以来全球平均气温升幅已达 1.1 °C,极端气候事件发生频率与强度皆呈现显著增长趋势 (Armstrong *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2023)。作为物种多样性最高的外温动物类群,因其体温调节完全依赖环境热源的特性,其生理生态过程对温度变化表现出高度敏感性 (González-Tokman *et al.*, 2020; Weaving *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2024a)。当环境温度突破物种特异性耐受阈值时,将引发蛋白质变性、线粒体功能障碍等细胞损伤,显著降低种群密度 (Yang *et al.*, 2024)。然而,在长期演化过程中,昆虫已形成包括形态、分子以及生理机制等多层次的温度适应策略,以避免温度所带来的不利影响 (González-Tokman *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2021)。

热休克蛋白 (Heat shock proteins, Hsps) 是一组由热应激诱导的蛋白质,最初在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中发现 (Ritossa, 1962)。Hsps 在生物体暴露于环境压力时被高度诱导,它们能够保护细胞蛋白质免受损伤,并维持生物体正常的代谢功能 (Xu *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2025)。根据分子量大小和序列同源性可将 Hsps 分为不同的家族:小热休克蛋白 (sHSP)、Hsp40、Hsp60、Hsp70、Hsp90 和 Hsp100 (Li *et al.*, 2025)。Hsp 超基因家族的成员已在哺乳动物、水生动物和昆虫中得到了系统的表征 (Ju-Ngam *et al.*, 2021; Stamperna *et al.*, 2021; Alghamdi *et al.*, 2023)。在昆虫中, Hsps 基因参与调节腐食酪螨 *Tyrophagus putrescentiae* 的生长发育,帮助其抵御温度变化 (Wang *et al.*, 2021)。Hsp70、Hsp21 和 sHsp21 这 3 种关键的热休克蛋白在莲草直胸跳甲 *Agasicles hygrophila* 的高温适应和提升繁殖力中发挥了重要作用 (Jin *et al.*, 2020)。在桃蚜 *Myzus persicae* 中, Hsp70 的表达受激素调控,敲除 Hsp70 基因会损害桃蚜的耐热性 (Chen *et al.*, 2022)。在松墨天牛 *Monochamus alternatus* 中,沉默 Hsp70-2 会显著影响其他 Hsp 基因的表达模式以及成虫的耐热性 (Li *et al.*, 2022)。虽然 Hsp 超基因家族在各种生物中得到了广泛的研究,但在萤火虫中尚未开展较为系统的研究。

雷氏萤 *Aquatica leii* 是中国独有的一种水生

萤火虫,2006 年由付新华发现并命名,其分类地位在 2010 年进行了修订 (Fu and Ballantyne, 2006; Fu *et al.*, 2010)。随后,雷氏萤在广西、湖北、湖南、江苏、山东、浙江等在多个省 (直辖市、自治区) 被发现 (Yang *et al.*, 2020)。事实上,全球变暖正对水生萤火虫的数量构成重大威胁,例如,在温度变化下雷氏萤的氨基酸和碳水化合物代谢方面代谢活动的受到显著影响 (Pérez-Hernández *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2025)。近年来,关于雷氏萤的研究主要集中在它们的分类学、形态学、生物发光和求偶展示 (Fu *et al.*, 2010; Fu and Meyer-Rochow, 2012; Fu and Zhu, 2024)。然而,在全球变暖背景下,关于雷氏萤的热休克蛋白及其如何应对高温的研究却鲜有报道。因此,本研究采用生物信息学方法在全基因组水平上鉴定了雷氏萤 Hsp 基因超家族,并利用 RNA-seq 技术研究了高温条件下 *AlHsp* 超基因家族的表达谱。本研究旨在全面了解雷氏萤中 Hsp 基因家族,并确定参与响应高温胁迫的成员。

1 材料与方法

1.1 昆虫材料和饲养条件

雷氏萤幼虫采集自钱江源国家森林公园,在浙江农林大学萤火虫繁殖基地饲养。随机选择 500 头 6 龄幼虫,将其转移到 50 cm×40 cm×15 cm 的水箱中,水箱中装有 4 L 已脱氯的自来水,使其适应环境。水温保持在 (22±1) °C, pH 6.5-7.5,溶解氧水平为 (7.0±0.3) mg/L,至少持续 7 d。雷氏萤幼虫每天喂食一次中国圆田螺 *Cipangopalidina chinensis*,中国圆田螺于浙江省杭州市临安区东湖村河边捕捉 (Liu *et al.*, 2025)。

1.2 高温处理和样品采集

参照已有研究 (Hermann *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2025),本研究分别设定了 20、24、28 和 32 °C 4 个温度处理,并以 20 °C 作为对照温度。实验所用幼虫均为 6 龄。在为期 7 d[接近湖泊热浪平均持续时间 (7.7±0.4) d] (Woolway *et al.*, 2021) 的处理中,每日 9:00-16:00 实施高温暴露:温度从 9:00 的 20 °C 起始,逐渐升至设

定的目标温度并保持至 16:00 (Hermann *et al.*, 2024)。随后, 从不同的温度处理和对照中分别收集了 30 个雷氏萤幼虫样本。每种处理都进行了 3 次实验。样品立即在液氮中冷冻, 并储存在 -80 °C, 以提取 RNA。

1.3 RNA 提取、转录组测序和组装和表达谱分析

根据生产商的方案, 使用 TRIzol™Plus RNA 纯化试剂盒 (Invitrogen, USA) 从雷氏萤幼虫中提取 RNA。使用 NanoPhotometer 分光光度计 (Implen GmbH, Mün-chen, Germany) 和 Qubit 2.0 荧光计 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 测量 RNA 纯度和浓度, 同时使用 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, California, USA) 评估 RNA 完整性 (Fu and Meyer-Rochow, 2021; Zhang *et al.*, 2021)。用 1.5% 琼脂糖凝胶检验 RNA 完整性和 DNA 污染。使用 Illumina Novaseq 6000 平台对文库进行测序, 生成 150 bp 的成对末端读数。使用 FastQC (v.0.11.9) 和 Fastp (v.0.19.5) 处理原始读取, 删除适配器和低质量读取, 从而得到干净的读取 (Chen *et al.*, 2018)。通过 HISAT2 (v.2.1.0) 构建雷氏萤的参考基因组 (NCBI 登录号 GCA_035610365.1) 的索引 (Fu and Zhu, 2024), 并使用 StringTie2 (v.2.1.5) 将成对的末端清洁读数与参考基因组进行比对, 并计算 FPKM。随后使用 DESeq2 R 包鉴定显著差异表达的 Hsps, 标准为 $|\log_2 \text{Fold change}| > 1.0$, Benja mini-Hochberg 调整的 P 值 (P_{adj}) ≤ 0.05 。

1.4 *AlHsp* 超基因家族的鉴定

雷氏萤基因组序列下载自 NCBI GenBank, 登录号为 GCA_035610365.1 (Fu and Zhu, 2024)。从 InsectBase 2.0 下载光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*、黑腹果蝇和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 Hsp 蛋白序列 (Mei *et al.*, 2022), 利用 HMMER 软件 (v.3.4) 构建隐马尔可夫模型, 并检索雷氏萤蛋白质数据库 (Mistry *et al.*, 2013)。为了确定 Hsp 蛋白的鉴定准确, 通过 Interpro (Blum *et al.*, 2025) 和 NCBI-CD (Wang *et al.*, 2023) 在线数据库进一步分析在候选 Hsp 蛋

白中是否含有保守的结构域 Hsp20 (PF00011)、Hsp60 (PF00118)、Hsp70 (PF00012) 和 Hsp90 (PF00183) (Xu *et al.*, 2022)。通过 ExPASy 的 Compute pI/MW 工具预测了 AlHsp 蛋白序列的等电点 (pI) 和分子量 (Molecular Weight, MW) (https://web.expasy.org/compute_pi/) (Wilkins *et al.*, 1999)。WoLF-PSORT 预测 AlHsp 蛋白的亚细胞定位 (<https://wolfsort.hgc.jp/>) (Horton *et al.*, 2007)。

1.5 AlHsp 的系统发育树构建

使用 MEGA 11.0 中的 Muscle 程序对雷氏萤、光肩星天牛、黑腹果蝇和赤拟谷盗的 Hsp 蛋白的全长氨基酸序列进行了序列比对。基于 MEGA 11.0 的比对蛋白序列, 在 LG+G 模型下使用最大似然 (Maximum-likelihood, ML) 方法构建系统发育树, 进行 1 000 次自举分析 (Tamura *et al.*, 2021)。系统发育树由 Evolview v2 在线工具可视化 (<https://evolgenius.info/evolview-v2/>) (Subramanian *et al.*, 2019)。

1.6 *AlHsps* 的染色体定位和进化分析

从 GFF3 文件中获取 *AlHsps* 基因家族成员的染色体位置信息, 通过 TBtools-II v2.154 软件 (Chen *et al.*, 2023) One-step MCScanX 进行基因复制, Simple Ka/Ks Calculator 计算同义突变频率 (K_s)、非同义突变频率 (K_a)、非同义突变率与同义突变率的比值 (K_a/K_s)。此外, 复制事件的近似时间通过 $T = K_s / (2\lambda)$ ($\lambda = 6.5 \times 10^{-9}$) 百万年前 (Million years ago, Mya) 计算得出 (Liu *et al.*, 2024b)。

1.7 *AlHsps* 的保守结构域及基因结构分析

使用在线软件 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme/>) 分析 Hsps 蛋白保守结构域, motif 数量设置 20, 宽度设置 6-50, 所有其他参数都是默认设置 (Bailey *et al.*, 2015)。使用 TBtools II (v2.154) 可视化保守基序的结果。从雷氏萤基因组注释文件中获得基因组序列和编码序列信息, 使用在线工具 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 可视化 (Hu *et al.*, 2015)。

1.8 *AlHsps* 的发光器组织表达模式分析

雷氏萤的蛹（蛹发育前期、中期和后期）发光器的 RNA-Seq 原始数据下载自 NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), 包括 SRX19768252、SRX1976825、SRX19768251、SRX19768250、SRX19768249、SRX119768248、SRX197168247、SRX197068246、SRX199768245、SRX19668244 (Fu and Zhu, 2024)。使用 HISAT2 (v2.1.0) (Kim *et al.*, 2019) 组装数据, StringTie2 (v2.1.5) (Kovaka *et al.*, 2019) 计算每千碱基转录本每百万个映射片段 (FPKM) 值, 分析结果利用 TBtools II (v2.154) 进行基因组织表达可视化。

2 结果与分析

2.1 *Hsp* 基因超家族的鉴定及染色体定位分析

本研究中, 使用基于雷氏萤、光肩星天牛、黑腹果蝇和赤拟谷盗蛋白序列构建的 (Hidden Markov Model, HMM), 在雷氏萤蛋白数据库中鉴定出总共 45 个 *AlHsp* 基因, 其中包含 3 个 *Hsp90*、19 个 *Hsp70*、9 个 *Hsp60* 和 14 个 *sHsp* 基因。*Hsp* 基因在染色体上的分布呈不规则分布模式, 分别分布在 LG01 (6, 13.33%)、LG02 (10, 22.22%)、LG03 (8, 17.78%)、和 LG04 (5, 11.11%)。此外, LG05 和 LG06 各自携带 1 个基

因。值得注意的是, 除 *AlsHsp28.56* 和 *AlsHsp21.36* 外, 所有 *sHsp* 基因都分布在 LG07 上 (图 1)。理化特征分析显示, *Hsp70* 家族是基因成员数量最多的亚家族, 该家族中的基因编码的蛋白质范围为 96-1 269 个氨基酸残基, 预测的等电点和分子量分别为 4.99-7.08 和 10.46-143.74 kD。*AlHsp60* 家族编码 531-1 145 个氨基酸的蛋白质, 等电点和分子量分别为 5.38-8.54 和 57.31-128.69 kD。*AlHsp90* 家族的 3 个成员含有 697-781 个氨基酸, 等电点范围为 4.94-7.63, 分子量在 79.40-89.34 kD 之间。*AlsHsp* 家族编码 150-441 个氨基酸, 等电点和分子量分别为 4.85-8.80 和 17.28-51.28 kD。*AlHsps* 主要位于细胞质中, 在线粒体、质膜、细胞外、内质网和细胞核中检测到少量成员 (表 1)。

2.2 *AlHsp* 蛋白的系统发育分析

为了研究 *AlHsp* 基因家族成员之间的进化关系和分类, 并基于其他物种的同源基因进一步预测它们在雷氏萤中的潜在作用, 基于 *Hsp* 蛋白的比对氨基酸序列构建了一个系统发育树, 包括 31 个 *AlHsps*、33 个 *DmHsps*、26 个 *TcHsps*、28 个 *AglaHsps*。如图 2 (A) 所示, *AlHsp* 蛋白被清楚地分为 3 个家族, 分别对应于 *Hsp60*、*AlHsp70* 和 *AlHsp90*。来自雷氏萤、光肩星天牛、黑腹果蝇和赤拟谷盗同一家族的所有 *Hsps* 聚集在一起, 表明这些基因在整个进化过程中相对保

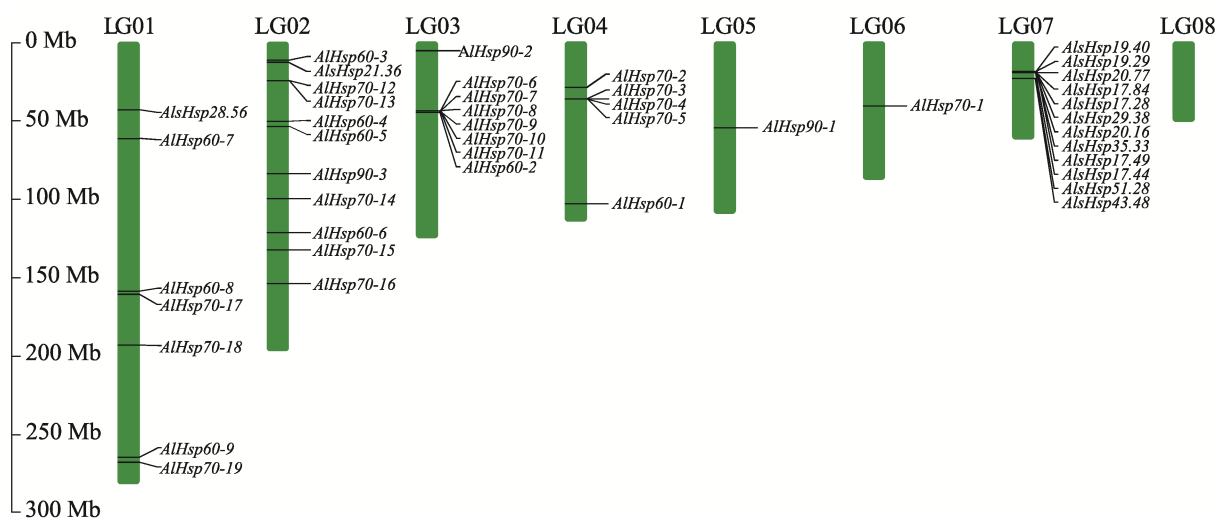


图 1 雷氏萤 *Hsp* 基因的染色体定位

Fig. 1 Chromosomal localization of *Hsp* gene in *Aquatica lei*

表 1 *AlHsp* 基因超家族的基因结构和理化特性
Table 1 Structural and biochemical features of the *Hsp* gene superfamily in *Aquatica leii*

家族 Family	基因编号 Gene ID	基因名字 Gene name	信使核 糖核酸 mRNA	编码区 (bp) CDS (bp)	蛋白质 (AA) Protein (AA)	分子量 (kD) Molecular weight (MW) (kD)	等电 点 PI	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>Hsp90</i>	RN001_012212	<i>AlHsp90-1</i>	9 313	2 346	781	89.34	4.94	内质网 Endoplasmic reticulum
	RN001_007164	<i>AlHsp90-2</i>	2 166	2 166	721	82.80	4.98	细胞质 Cytoplasm
	RN001_005174	<i>AlHsp90-3</i>	27 672	2 094	697	79.40	7.63	线粒体 Mitochondrion
<i>Hsp70</i>	RN001_013524	<i>AlHsp70-1</i>	1 884	1 884	627	69.09	6.35	细胞质 Cytoplasm
	RN001_009464	<i>AlHsp70-2</i>	2 266	1 959	652	71.79	5.16	细胞质 Cytoplasm
	RN001_009550	<i>AlHsp70-3</i>	1 945	1 899	632	71.59	5.96	细胞质 Cytoplasm
	RN001_009551	<i>AlHsp70-4</i>	1 962	1 914	637	72.03	5.77	细胞质 Cytoplasm
	RN001_009552	<i>AlHsp70-5</i>	1 943	1 896	631	70.58	6.32	细胞质 Cytoplasm
	RN001_007703	<i>AlHsp70-6</i>	1 920	1 920	639	70.47	5.68	细胞质 Cytoplasm
	RN001_007704	<i>AlHsp70-7</i>	1 920	1 920	639	70.44	5.84	细胞质 Cytoplasm
	RN001_007705	<i>AlHsp70-8</i>	1 935	1 935	644	70.95	6.00	细胞质 Cytoplasm
	RN001_007706	<i>AlHsp70-9</i>	1 926	1 926	641	70.60	5.69	细胞质 Cytoplasm
	RN001_007707	<i>AlHsp70-10</i>	1 926	1 926	641	70.67	5.72	细胞质 Cytoplasm
	RN001_007708	<i>AlHsp70-11</i>	1 926	1 926	641	70.58	5.54	细胞质 Cytoplasm
	RN001_004473	<i>AlHsp70-12</i>	343	291	96	10.46	4.99	细胞外 Extracellular
	RN001_004474	<i>AlHsp70-13</i>	3 476	1 512	503	55.78	5.04	细胞质 Cytoplasm
	RN001_005389	<i>AlHsp70-14</i>	2 519	1 773	590	64.81	5.35	细胞质/核 Cytoplasm/nucleus
	RN001_006080	<i>AlHsp70-15</i>	8 555	2 073	690	75.43	7.08	线粒体 Mitochondrion
<i>Hsp60</i>	RN001_006345	<i>AlHsp70-16</i>	2 174	1 893	630	69.37	5.44	细胞质 Cytoplasm
	RN001_002463	<i>AlHsp70-17</i>	6 212	2 430	809	91.27	5.39	细胞质 Cytoplasm
	RN001_002991	<i>AlHsp70-18</i>	2 757	2 757	918	103.92	5.14	细胞质 Cytoplasm
	RN001_003971	<i>AlHsp70-19</i>	83 880	3 810	1 269	143.74	5.31	细胞核 Nucleus
	RN001_011002	<i>AlHsp60-1</i>	1 811	1 596	531	58.11	6.69	细胞质 Cytoplasm
	RN001_007731	<i>AlHsp60-2</i>	5 149	1 719	572	61.11	5.38	线粒体 Mitochondrion
	RN001_004301	<i>AlHsp60-3</i>	1 816	1 605	534	58.09	5.76	细胞质 Cytoplasm
	RN001_004751	<i>AlHsp60-4</i>	2 312	1 677	558	60.06	5.96	线粒体 Mitochondrion
	RN001_004799	<i>AlHsp60-5</i>	1 859	1 632	543	59.33	5.43	线粒体 Mitochondrion
	RN001_005893	<i>AlHsp60-6</i>	49 680	3 438	1 145	128.69	8.54	细胞核 Nucleus
	RN001_000918	<i>AlHsp60-7</i>	3 578	1 641	546	60.04	6.36	线粒体 Mitochondrion
	RN001_002402	<i>AlHsp60-8</i>	2 953	1 632	543	59.10	5.97	细胞质 Cytoplasm
	RN001_003907	<i>AlHsp60-9</i>	2 097	1 605	534	57.31	6.41	细胞质 Cytoplasm

续表 1 (Table 1 continued)

家族 Family	基因编号 Gene ID	基因名字 Gene name	信使核 糖核酸 mRNA	编码区 (bp) CDS (bp)	蛋白质 (AA) Protein (AA)	分子量 (kD) Molecular weight (MW) (kD)	等电 点 PI	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>sHSP</i>	RN001_014774	<i>AlsHsp17.28</i>	456	456	151	17.28	6.60	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014800	<i>AlsHsp17.44</i>	453	453	150	17.44	6.60	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014798	<i>AlsHsp17.49</i>	7 666	453	150	17.49	6.52	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014772	<i>AlsHsp17.84</i>	522	471	156	17.84	6.76	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014745	<i>AlsHsp19.29</i>	504	504	167	19.29	6.71	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014741	<i>AlsHsp19.40</i>	504	504	167	19.40	5.39	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014796	<i>AlsHsp20.16</i>	525	525	174	20.16	7.09	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014771	<i>AlsHsp20.77</i>	6 454	552	183	20.77	5.03	细胞质 Cytoplasm
	RN001_004338	<i>AlsHsp21.36</i>	2 360	570	189	21.36	5.48	细胞质/核 Cytoplasm/nucleus
	RN001_000550	<i>AlsHsp28.56</i>	21 324	738	245	28.56	8.80	线粒体 Mitochondrion
	RN001_014795	<i>AlsHsp29.38</i>	8 398	750	249	29.38	5.90	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014797	<i>AlsHsp35.33</i>	6 824	906	301	35.33	6.48	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014911	<i>AlsHsp43.48</i>	45 133	1 146	381	43.48	4.85	细胞质 Cytoplasm
	RN001_014907	<i>AlsHsp51.28</i>	16 133	1 326	441	51.28	8.75	细胞膜 Plasma membrane

守。这与 Interpro 和 NCBI CDD 结果得出的 *AlHsps* 的初步分类非常一致。

由于 *sHsp* 家族成员的序列较短，我们基于 14 个 *AlsHsp*、7 个 *DmsHsp*、10 个 *TcsHsp*、21 个 *AglasHsp* 构建了一个单独的系统进化树(图 2:B)。 *AlsHsp* 的大多数聚集在一起，但 *AlsHsp21.36* 和 *AlsHsp28.56* 与不同昆虫物种的亲缘关系更为密切，表明一些 *sHsp* 家族成员存在广泛的进化差异。值得注意的是，除 *AlsHsp51.28* 外，所有 *sHsp* 蛋白都位于细胞质中。

2.3 *AlHsp* 基因家族成员保守基序分析

基于系统发育分析，进一步分析了 *AlHsp* 基因家族成员的保守基序。如图 3 所示， *AlHsp* 基因分为 *Hsp90*、*Hsp70*、*Hsp60* 和 *sHsp* 家族，同一亚家族的基因聚集在一起。为了研究 *Hsp* 亚家族的这些特征，分析了 20 个 Motif。结果表明， *AlHsps* 的 Motif 结构在不同亚家族的成员之间差异很大，但在同一组的成员之间是相似的。此外，一些 Motif 是某些系统发育群所特有的。例如，大部分 *sHsp* 都包含 Motif 5、7、4、11 和 6M，而 *AlsHsp28.56* 不含 Motif 7， *AlsHsp21.36* 不含

Motif 7 和 11。 *AlsHsp21.36* 和 *AlsHsp28.56* 可能已经在进化上出现分化，这与系统发育结果一致(图 2: A, B, 图 3)。 *AlHsp70* 含有最多数量的 Motif，大部分 *AlHsp70* 中 Motif 的数目为 20 个，其中 *AlHsp70-12*、和 *AlHsp70-19* 较为特殊， *AlHsp70-12* 仅包含 Motif 12、14 和 19， *AlHsp70-19* 仅包含 Motif 1、2、4 和 18，这可能是它们在进化过程中发生了分化。与此相反， *AlHsp90* 和 *AlHsp60* 亚家族的 Motif 组成则相对简单： *AlHsp90* 亚家族各成员均只含有 2-4 个 Motif； *AlHsp60* 亚家族多数成员含有 1-3 个 Motif，而 *AlHsp60-5* 和 *AlHsp60-6* 甚至不含有任何 Motif，提示其在进化或功能上可能存在特殊分化。

2.4 *AlHsp* 基因家族成员基因结构分析

基因结构分析结果显示， *AlHsp* 的长度和内含子数量不同，内含子数量从 0-11 不等。 *AlHsp70-18*、*AlHsp70-1*、*AlHsp70-7*、*AlHsp70-6*、*AlHsp70-9*、*AlHsp70-8*、*AlHsp70-11* 和 *AlHsp70-10* 基因没有内含子， *AlHsp70-5*、*AlHsp70-3*、*AlHsp70-4*、*AlHsp70-12*、*AlHsp70-13* 和 *AlHsp70-14*

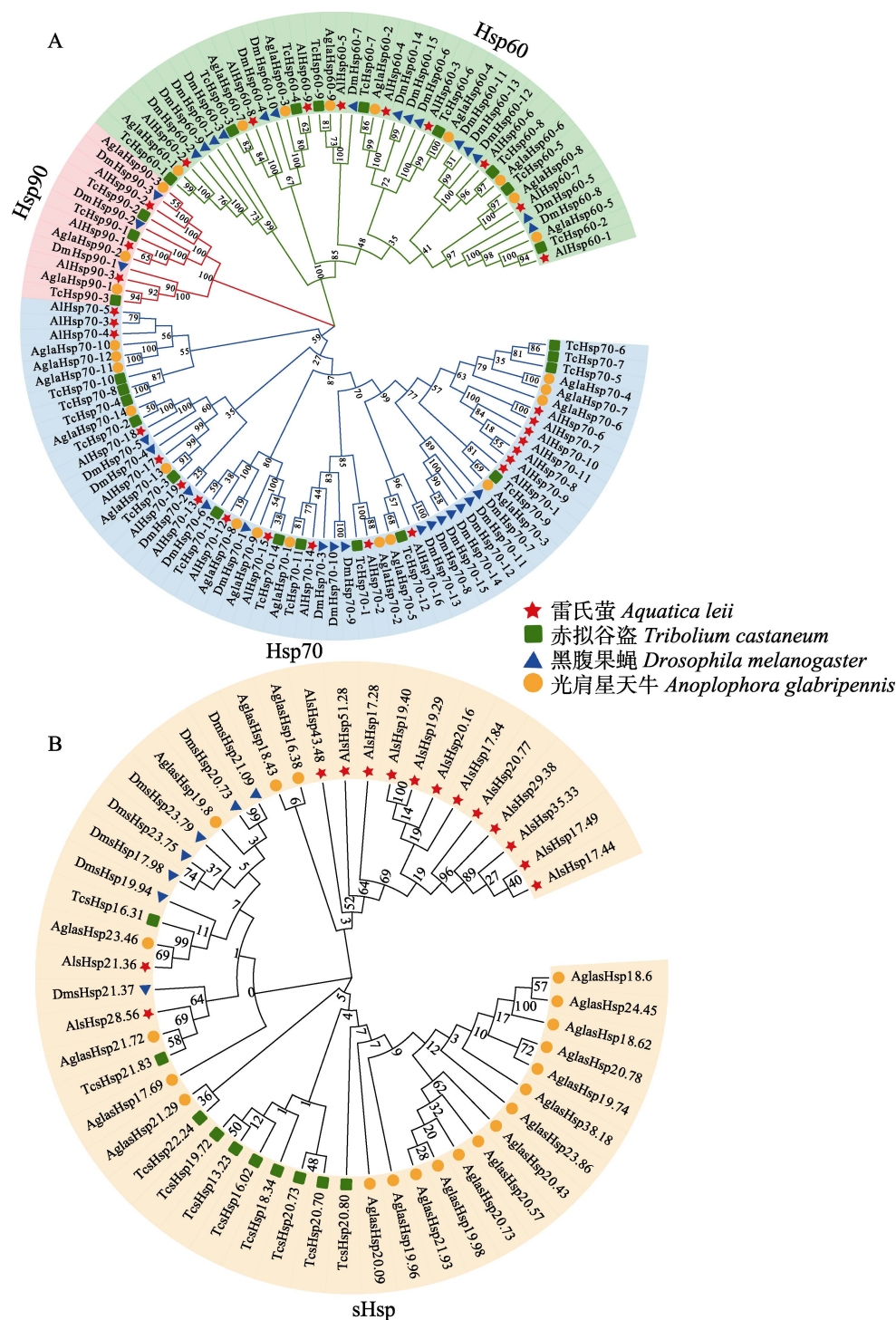


图2 雷氏萤 Hsp 蛋白系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of Hsp proteins in *Aquatica lei*

A. 基于 Hsp60、Hsp70 和 Hsp90 蛋白序列构建的系统发育树。图中不同颜色的区域分别代表 Hsp60 (绿色)、Hsp70 (蓝色) 和 Hsp90 (粉色) 家族; B. 基于小热休克蛋白 (sHsp) 序列构建的系统发育树。Al: 雷氏萤 *Aquatica lei*; Tc: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; Dm: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; Ag: 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*。

A. Phylogenetic tree constructed based on Hsp60, Hsp70, and Hsp90 protein sequences, with differently colored regions representing the Hsp60 (green), Hsp70 (blue), and Hsp90 (pink) families, respectively; B. Phylogenetic tree constructed based on small heat shock protein (sHsp) sequences.

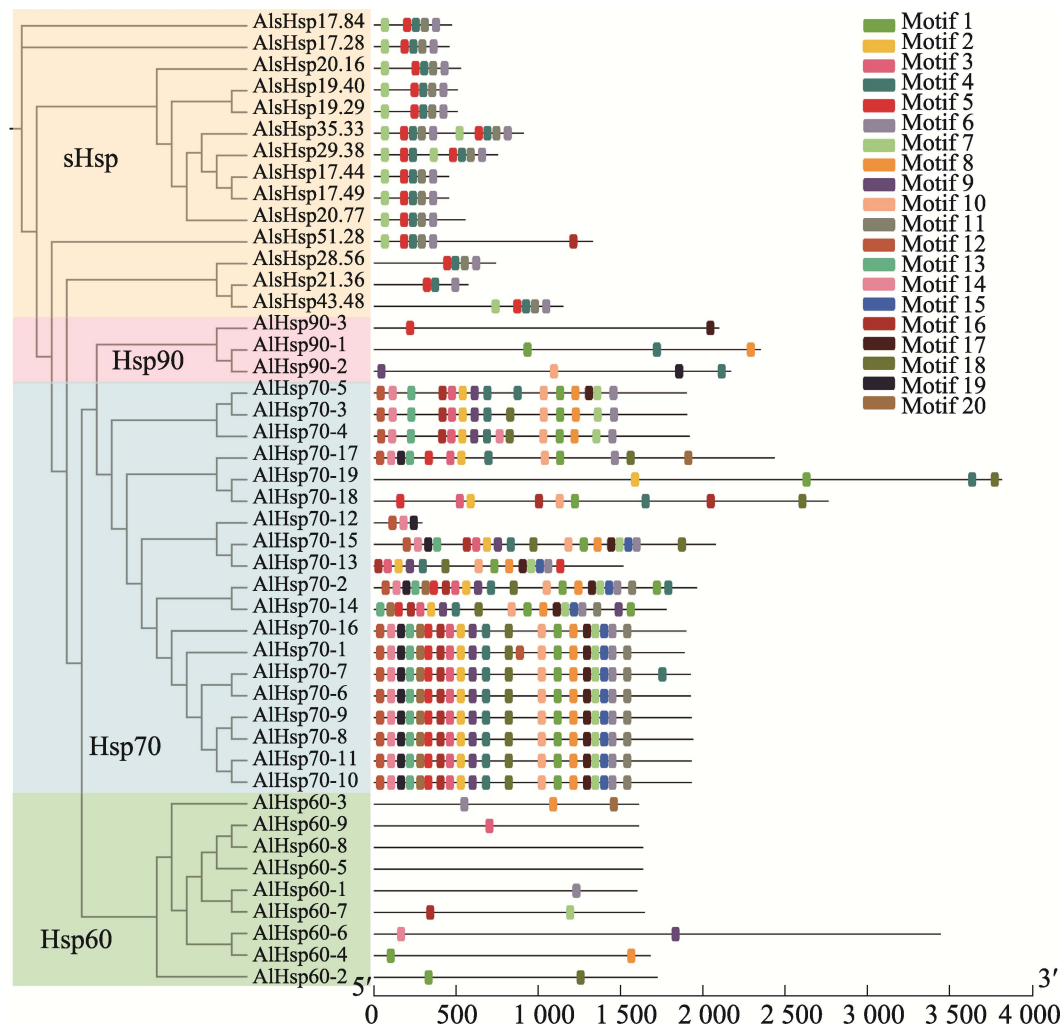


图3 AIHsp 蛋白系统发育关系和保守基序的示意图

Fig. 3 Schematic representation of phylogenetic relationship and conserved motifs of AIHsp proteins

有 1 个内含子, *AIHsp70-16* 有 2 个内含子, *AIHsp70-15* 和 *AIHsp70-2* 有 6 个内含子, *AIHsp70-17* 和 *AIHsp70-19* 分别有 8 和 9 内含子。*Hsp60* 基因包含 2 (*AIHsp70-1* 和 *AIHsp70-3*)-11 个 (*AIHsp70-6*) 内含子。此外, 3 个 *Hsp90* 家族成员的遗传结构存在很大差异, *AIHsp90-2* 没有内含子, *AIHsp90-1* 和 *AIHsp90-3* 分别有 4 和 10 个内含子。相比之下, *sHsp* 家族的基因结构相对保守。除了 *AlsHsp43.48* 和 *AlsHsp51.28* 分别有 3 和 5 个内含子外, 其他 *sHsp* 基因有 0-2 个内含子 (图 4)。

2.5 AIHsp 基因的复制分析

本研究还分析了 *AIHsp* 的基因复制模式, 共检测到 19 对串联重复的 *AIHsp* 基因 (表 2), 并

且发生串联重复主要是 *Hsp70*, 这说明串联重复可能是雷氏萤 *Hsp* 进化的主要驱动力。为了进一步算进化日期和随后的选择对基因复制的影响, 计算其基因对的 K_a 和 K_s 。 K_a/K_s 值大于 1 表示 (正) 选择, 而 K_a/K_s 值等于 1 表示中性进化, 而 K_a/K_s 值小于 1 (尤其是小于 0.5) 表示纯化 (负) 选择 (Yang and Bielawski, 2000)。在本研究中 19 对串联重复的 K_a/K_s 比值都小于 0.5, 说明纯化选择在 *AIHsp* 基因进化中起着主导作用。此外, 这些重复事件的进化时间推算表明, 19 个串联重复可能发生在约 685 万年至 16 489 万年前。

2.6 AIHsp 基因在发光器中的表达

本研究进一步利用公开的 RNA-Seq 数据分析了蛹的前中后 3 个阶段发光器中 *AIHsp* 的表达

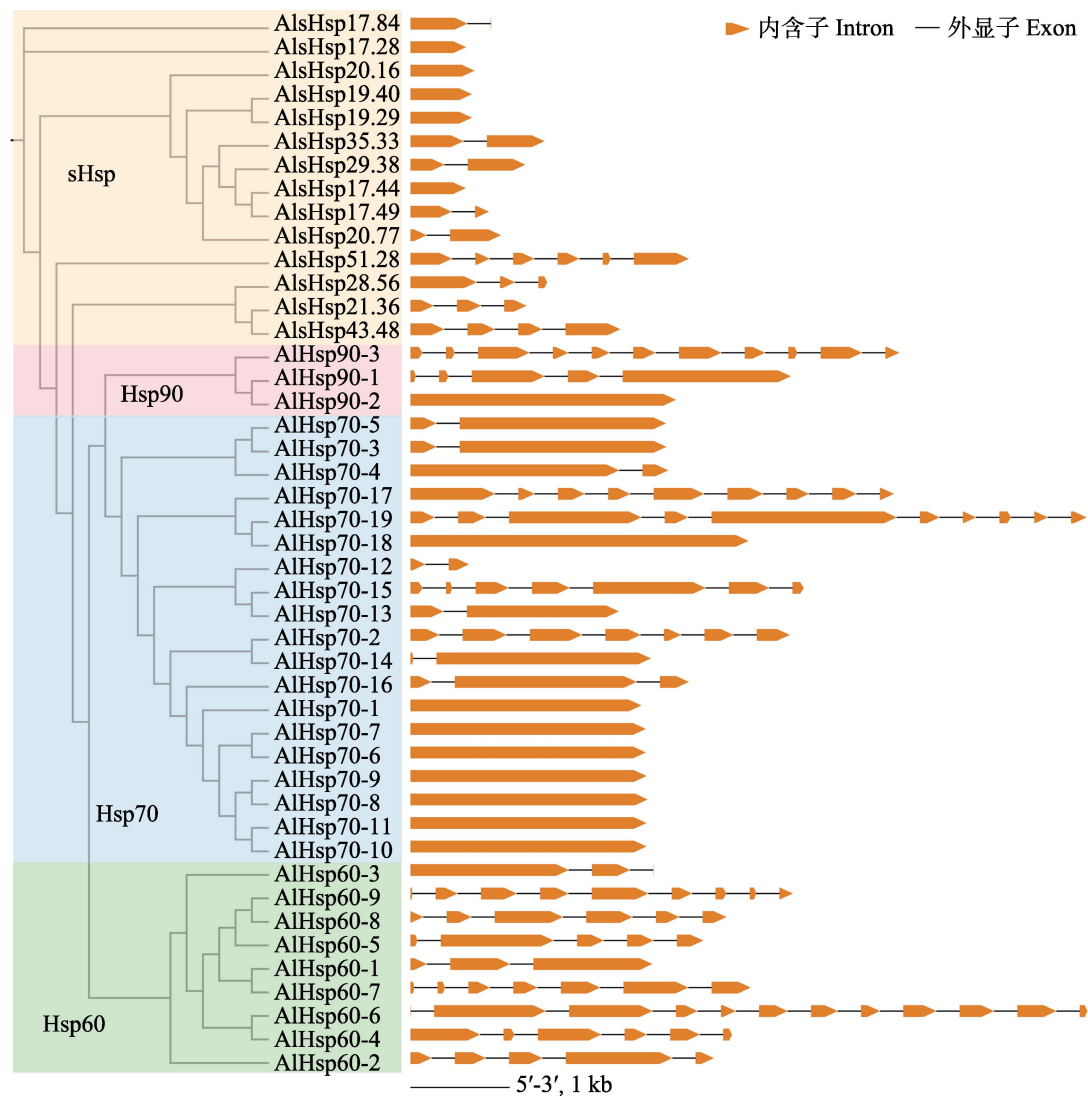


图 4 *AlHsp* 基因系统发育关系和基因结构示意图

Fig. 4 Schematic representation of phylogenetic relationship and gene structure of *AlHsp*

表 2 *AlHsp* 基因超家族成员的基因复制事件

Table 2 Analysis of gene replication events in *AlHsp* gene superfamily members of *Aquatica leii*

重复基因 Duplicated genes	非同义替 换率 K_a	同义替 换率 K_s	非同义替换率/非 同义替换率 K_a/K_s	分化时间 (百万年) Divergence time (million years)	重复类型 Duplicated type
<i>AlHsp70-3</i> , <i>AlHsp70-4</i>	0.305 53	2.143 62	0.142 53	164.893 77	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-3</i> , <i>AlHsp70-5</i>	0.269 76	NaN	NaN	NaN	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-4</i> , <i>AlHsp70-5</i>	0.312 58	NaN	NaN	NaN	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-6</i> , <i>AlHsp70-7</i>	0.016 75	0.149 96	0.111 68	11.535 68	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-6</i> , <i>AlHsp70-8</i>	0.038 54	0.574 86	0.067 04	44.220 15	串联重复 Tandem replication

续表 2 (Table 2 continued)

重复基因 Duplicated genes	非同义替 换率 Ka	同义替 换率 Ks	非同义替换率/非 同义替换率 Ka/Ks	分化时间 (百万年) Divergence time (million years)	重复类型 Duplicated type
<i>AlHsp70-6, AlHsp70-9</i>	0.034 61	0.535 99	0.064 57	41.230 00	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-6, AlHsp70-10</i>	0.033 22	0.471 83	0.070 40	36.294 59	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-6, AlHsp70-11</i>	0.033 19	0.473 83	0.070 04	36.448 48	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-7, AlHsp70-8</i>	0.032 60	0.588 23	0.055 43	45.248 77	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-7, AlHsp70-9</i>	0.029 41	0.582 62	0.050 48	44.816 77	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-7, AlHsp70-10</i>	0.028 03	0.514 28	0.054 50	39.559 94	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-7, AlHsp70-11</i>	0.028 00	0.534 96	0.052 35	41.151 06	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-8, AlHsp70-9</i>	0.009 50	0.161 46	0.058 86	12.419 88	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-8, AlHsp70-10</i>	0.009 51	0.198 42	0.047 93	15.262 81	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-8, AlHsp70-11</i>	0.010 87	0.187 35	0.058 02	14.411 63	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-9, AlHsp70-10</i>	0.006 78	0.115 02	0.058 92	8.847 88	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-9, AlHsp70-11</i>	0.006 77	0.089 32	0.075 81	6.870 44	串联重复 Tandem replication
<i>AlHsp70-10, AlHsp70-11</i>	0.004 06	0.089 08	0.045 56	6.852 50	串联重复 Tandem replication
<i>AlsHsp35.33, AlsHsp17.49</i>	0.030 13	0.318 47	0.094 60	24.497 52	串联重复 Tandem replication

水平。结果表明 (图 5), 45 个 *AlHsp* 基因至少在蛹一个阶段的发光器组织中表达, 且 $\text{FPKM} \geq 1.0$ 。其中, 18 个 *AlHsp* (*AlHsp70-14*、*AlHsp90-2*、*AlsHsp21.36*、*AlsHsp28.56*、*AlHsp60-2*、*AlHsp70-13*、*AlHsp60-1*、*AlHsp60-9*、*AlsHsp19.29*、*AlHsp60-7*、*AlHsp90-1*、*AlHsp60-8*、*AlHsp60-4*、*AlHsp60-5*、*AlHsp70-12*、*AlHsp60-3*、*AlsHsp17.84*、*AlHsp70-15*) 在蛹前期的发光器具有较高的表达水平 ($\text{FPKM} \geq 100.0$), 18 个 *AlHsp* (*AlHsp70-14*、*AlHsp90-2*、*AlsHsp21.36*、*AlHsp70-13*、*AlHsp60-2*、*AlsHsp28.56*、*AlHsp60-1*、*AlHsp60-9*、*AlHsp70-12*、*AlHsp90-1*、*AlHsp60-7*、*AlsHsp19.29*、*AlHsp60-8*、

AlHsp60-4、*AlHsp70-15*、*AlHsp60-3*、*AlsHsp17.84*、*AlHsp60-5*) 在蛹中期的发光器具有较高的表达水平 ($\text{FPKM} \geq 100.0$), 9 个 *AlHsp* (*AlHsp70-14*、*AlHsp90-2*、*AlsHsp21.36*、*AlsHsp28.56*、*AlHsp70-13*、*AlHsp60-2*、*AlHsp70-16*、*AlHsp70-12*、*AlHsp90-1*) 在蛹后期的发光器具有较高的表达水平 ($\text{FPKM} \geq 100.0$)。值得注意的是, 有 20 个 *AlHsp* 随着蛹的发育, 它们在发光器中的表达逐渐降低。其中, *AlHsp70-14* 和 *AlHsp90-2* 的表达量极高 ($\text{FPKM} \geq 1\ 000.0$)。这些结果表明, 这样的组织表达模式可能表明 *AlHsp* 在雷氏萤发光发育和发光中也发挥着一定的作用。

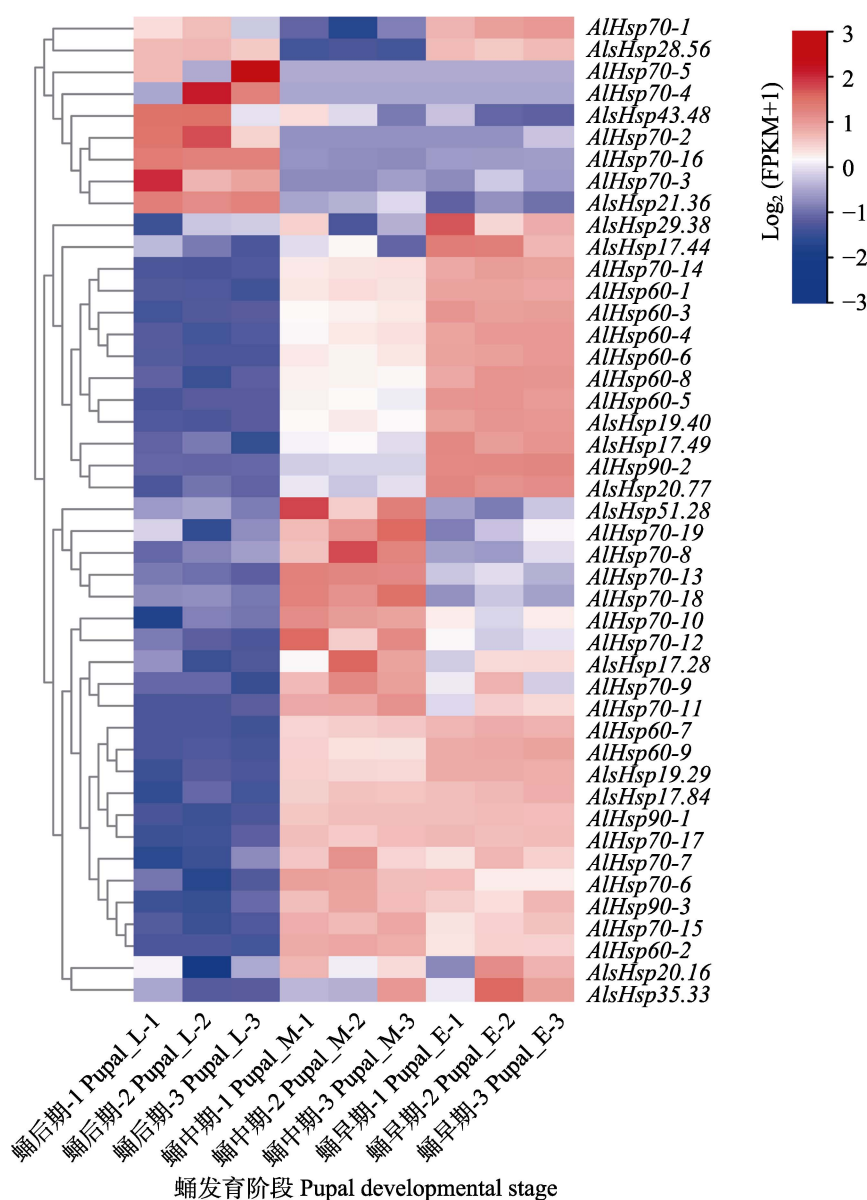


图 5 *AlHsp* 基因在雷氏萤蛹的不同发育阶段发光器官中的表达

Fig. 5 Expression of *AlHsp*s gene in light organ at different developmental stages of *Aquatica leii* pupae

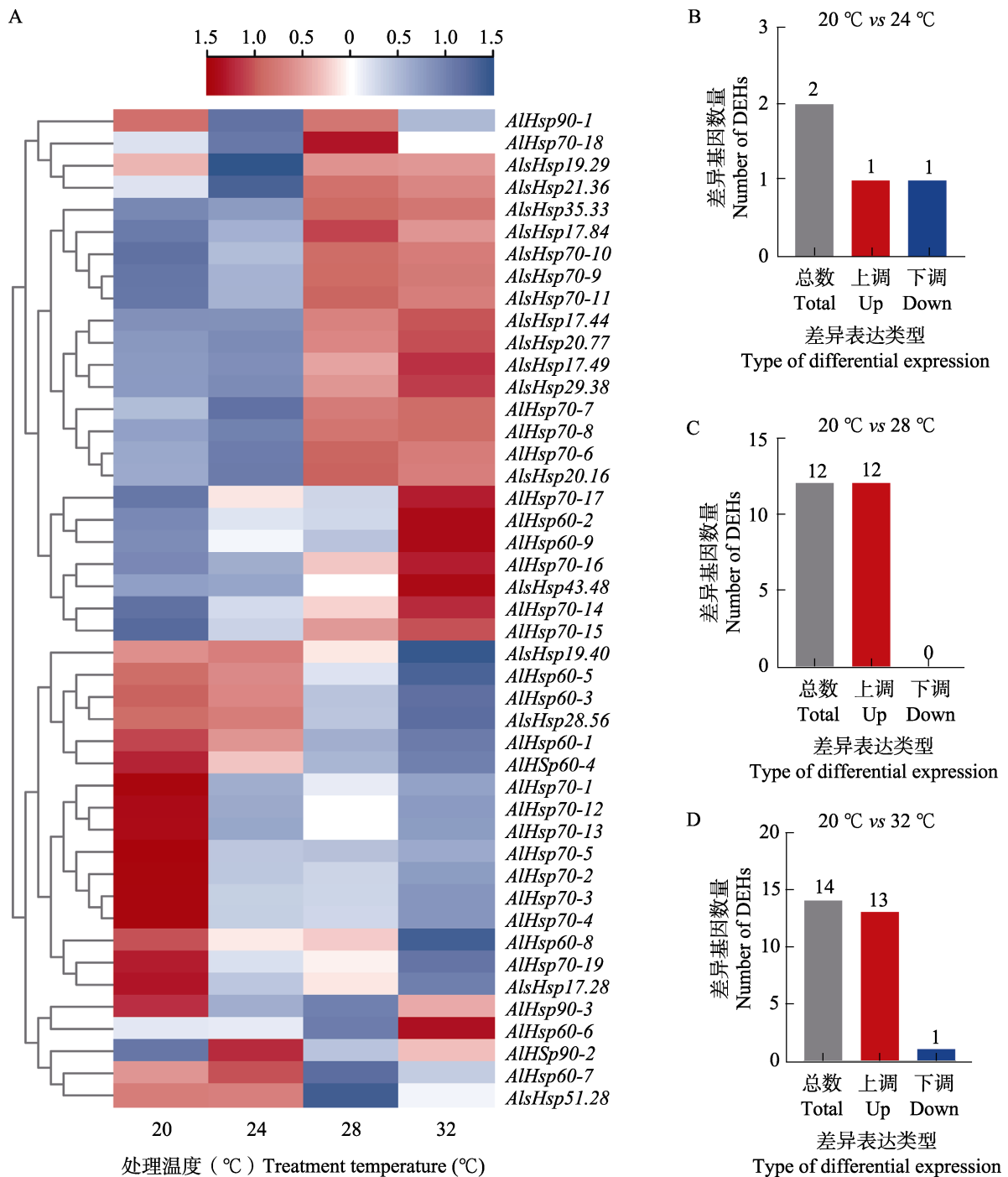
E: 前期; M: 中期; L: 后期。

E: Early stage; M: Middle stage; L: Late stage.

2.7 *AlHsp* 超基因家族在不同温度处理下的表达分析

为了进一步了解 *AlHsp* 基因在高温胁迫下的转录表达情况, 对 20、24、28、和 32 °C 处理的雷氏萤末龄幼虫进行了 RNA-seq 测序, 并分析了它们在高温下的表达谱 (图 6: A)。结果表明, 24 °C 处理有 2 个差异 *Hsps* (图 6: B), 28 °C 处理有 12 个差异 *Hsps* (图 6: C), 21 °C 处理有

14 个差异 *Hsps* (图 6: D)。雷氏萤在不同的温度环境中, 均存在一些特异性表达的基因 (*Hsp70* 和 *sHsp*), 它们通过改变特异性基因表达来适应环境。此外, 本研究发现 *AlHsp70-7*、*AlHsp70-8*、*AlsHsp17.44*、*AlsHsp17.49*、*AlsHsp20.77* 和 *AlsHsp29.38* 随着温度的增加, 表达量也在逐步增加。这表明它们可能被温度胁迫所诱导, 以增强细胞对高温的耐受性, 帮助细胞应对热胁迫带来的损伤, 维持细胞的生存和正常生理活动。

图 6 *AlHsp* 基因在不同温度处理下的表达分析Fig. 6 Expression analysis of *AlHsp* gene in different temperature treatments

A. 不同温度处理下热激蛋白基因表达模式的热图分析。左侧树状图表示基因表达模式的层次聚类。

B-D. 不同温度比较组中差异表达基因的数量统计。B. 20 °C vs 24 °C; C. 20 °C vs 28 °C; D. 20 °C vs 32 °C。

灰色、红色和蓝色柱子分别表示差异表达基因的总数、上调基因数和下调基因数。

A. Heatmap analysis of the expression patterns of heat shock protein (HSP) genes under different temperature treatments.

The dendrogram on the left shows the hierarchical clustering of gene expression patterns.

B-D. Statistics of the number of differentially expressed genes (DEGs) in different temperature comparison groups.

B. 20 °C vs 24 °C; C. 20 °C vs 28 °C; D. 20 °C vs 32 °C. The gray, red, and blue bars represent the total number, up-regulated genes, and down-regulated genes of DEGs, respectively.

3 讨论

对雷氏萤 *Hsp* 超基因家族进行了系统的鉴定分析, 共鉴定到 45 个 *Hsp* 家族成员, 包含 3 个 *Hsp90*、19 个 *Hsp70*、9 个 *Hsp60* 和 14 个 *sHsp* 基因。根据雷氏萤、光肩星天牛、黑腹果蝇和赤拟谷盗的 *Hsp* 蛋白的系统发育关系, 雷氏萤的 *Hsp* 超基因家族被分为 *sHsp*、*Hsp60*、*AlHsp70* 和 *AlHsp90* 四个亚家族。同样, 基因结构和保守基序的结果也支持这样的分类, 每个亚家族成员间都有相似的基因结构和保守基序。这之前报道的光肩星天牛、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* *Hsp* 基因结构和保守基序一致 (Xu *et al.*, 2022; Turan, 2023; Liu *et al.*, 2024a)。

研究表明, *Hsps* 有助于提高温度耐受性 (Xu *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2025)。本研究获得了 45 个 *AlHsps*。因此, 通过转录组测序获得了雷氏萤 *Hsp* 基因超家族在高温胁迫下的表达模式, 并且对差异 *Hsps* 进行了筛选。结果表明, 在高温胁迫下显著差异的只有 *Hsp70* 和 *sHsp* 两个亚家族 (图 6: A-D)。*HSP70* 是一种高度保守的蛋白质, 充当分子伴侣, 是对高温响应的关键性指标 (Neven, 2000)。在本研究中, *AlHsp70-6*、*AlHsp70-7*、*AlHsp70-8*、*AlHsp70-9*、*AlHsp70-10* 和 *AlHsp70-11* 基因均由高温胁迫诱导, 这之前报道的烟粉虱中大多数 *BtaS70* 基因是由热应激诱导结果一致 (Zheng *et al.*, 2022)。作为 *Hsp* 超家族中序列保守性最低的亚家族, *sHsp* 在核苷酸序列与分子量上呈现高度异质性, 但其成员仍普遍保留保守的结构域特征 (Bai *et al.*, 2019)。越来越多的研究发现, *sHsp* 与昆虫的许多重要功能密切相关, 例如调节生长和繁殖, 增强了昆虫适应环境压力的能力等。在本研究中, 大量的 *sHsp* 在蝇发光器中有较高的表达值, 且 *AlsHsp17.44*、*AlsHsp17.49*、*AlsHsp19.40*、*AlsHsp20.16*、*AlsHsp20.77*、*AlsHsp29.38* 和 *AlsHsp35.33* 基因由高温诱导, 转录表达显著差异。这之前在烟粉虱和草地贪夜蛾中的研究结果一致 (Bai *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2024)。总的来说, *AlHsp70* 和 *AlsHsp* 的大部分基因在可能高

温胁迫应答中发挥了重要作用。因此, 本研究结果有助于阐明 *Hsp* 超基因家族的扩增, 并进一步分析其在雷氏萤高温抗性中的功能。

研究表明基因复制事件 (包括节段和串联重复) 在基因组重排中是必不可少的, 并且经常导致基因家族的扩张 (Cannon *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2022)。在这项研究中, 19 对串联重复对参与了基因复制 (表 2), 其中 18 对串联重复为 *Hsp70*, 1 对为 *sHsp*, 因此推断串联重复是雷氏萤 *Hsp* 超基因家族扩张的主要原因, 并且 *Hsp70* 为主要扩张亚家族。串联重复主要来自于染色体的不等交换, 导致基因家族中的重复基因数量增加, 但通常不会显著改变基因组的大小 (王同欢等, 2023)。此外, 除了 2 对串联重复基因 (*AlHsp70-3/AlHsp70-5* 和 *AlHsp70-4/AlHsp70-5*), 其余 17 对串联重复基因对的 *Ka/Ks* 值均小于 1, 这说明纯化选择在 *AlHsp* 超基因家族进化中发挥着主要作用, 即发生的有害突变会被主动清除。

4 结论

在本研究中, 通过基因鉴定和保守基序、基因结构、组织表达以及高温胁迫下的转录组分析, 对雷氏萤 *Hsp* 超基因家族进行了首次综合研究。在雷氏萤基因组中鉴定到 45 个 *Hsp* 家族成员, 包含 3 个 *Hsp90*、19 个 *Hsp70*、9 个 *Hsp60* 和 14 个 *sHsp* 基因, 这可以为雷氏萤 *Hsp* 基因家族的功能特征提供重要信息。此外, 蝇的发光器组织表达分析表明, *AlHsp* 基因可能参与雷氏萤发光器官的发育和发光。转录组分析表明, *AlHsp70-7*、*AlHsp70-8*、*AlsHsp17.44*、*AlsHsp17.49*、*AlsHsp20.77* 和 *AlsHsp29.38* 被温度胁迫所诱导, 随着温度的增加, 表达量也在逐步增加。这些结果有助于进一步探索 *AlHsp* 基因介导的高温胁迫响应过程和分子机制, 能为系统地研究雷氏萤 *Hsp* 基因家族的功能提供重要依据。

参考文献 (References)

- Alghamdi AA, Alattal YZ, 2023. Expression levels of heat-shock proteins in *Apis mellifera jemenetica* and *Apis mellifera carnica* foragers in the desert climate of Saudi Arabia. *Insects*, 14(5): 432.
- Armstrong McKay DI, Staal A, Abrams JF, Winkelmann R,

- Sakschewski B, Loriani S, Fetzter I, Cornell SE, Rockström J, Lenton TM, 2009. Exceeding 1.5 °C global warming could trigger multiple climate tipping points. *Science*, 377(6611): eabn7950.
- Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS, 2015. The MEME suite. *Nucleic Acids Research*, 43(W1): W39–W49.
- Bai J, Liu XN, Lu MX, Du YZ, 2019. Characterization of genes encoding small heat shock proteins from *Bemisia tabaci* and expression under thermal stress. *PeerJ*, 7: e6992.
- Blum M, Andreeva A, Florentino LC, Chuguransky SR, Grego T, Hobbs E, Pinto BL, Orr A, Paysan-Lafosse T, Ponamareva I, Salazar GA, Bordin N, Bork P, Bridge A, Colwell L, Gough J, Haft DH, Letunic I, Llinares-López F, Marchler-Bauer A, Meng-Papaxanthos L, Mi H, Natale DA, Orengo CA, Pandurangan AP, Piovesan D, Rivoire C, Sigrist CJA, Thanki N, Thibaud-Nissen F, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A, 2025. InterPro: The protein sequence classification resource in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1): D444–D456.
- Cannon SB, Mitra A, Baumgarten A, Young ND, May G, 2004. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 4(1): 10.
- Chen C, Wu Y, Li J, Wang X, Zeng Z, Xu J, Liu Y, Feng J, Chen H, He Y, Xia R, 2023. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 16(11): 1733–1742.
- Chen N, Tan JY, Wang Y, Qi MH, Peng JN, Chen DX, Li MY, 2022. A heat shock protein 70 protects the green peach aphid (*Myzus persicae*) against high-temperature stress. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25(4): 101992.
- Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J, 2018. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17): i884–i890.
- Fu X, Ballantyne L, 2006. *Luciola leii* sp. nov.; A new species of aquatic firefly (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) from mainland China. *The Canadian Entomologist*, 138(3): 339–347.
- Fu XH, Ballantyne LA, Lambkin CL, 2010. *Aquatica* gen. nov. from mainland China with a description of *Aquatica wuhana* sp. nov. (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). *Zootaxa*, 2530(1): 1–18.
- Fu X, Meyer-Rochow VB, 2012. An investigation into the morphological and behavioral adaptations of the aquatic larvae of *Aquatica leii* (Coleoptera: Lampyridae) to prey upon freshwater snails that serve as intermediate hosts for the liver fluke. *Biological Control*, 62(3): 127–134.
- Fu X, Meyer-Rochow VB, 2021. Selection and validation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in the rare aquatic firefly *Aquatica leii* (Coleoptera: Lampyridae). *Insects*, 12(4): 359.
- Fu X, Zhu X, 2024. Key homeobox transcription factors regulate the development of the firefly's adult light organ and bioluminescence. *Nature Communications*, 15: 1736.
- González-Tokman D, Córdoba-Aguilar A, Dáttilo W, Lira-Noriega A, Sánchez-Guillén RA, Villalobos F, 2020. Insect responses to heat: Physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 95(3): 802–821.
- Hermann M, Peeters ETHM, Van den Brink PJ, 2023. Heatwaves, elevated temperatures, and a pesticide cause interactive effects on multi-trophic levels of a freshwater ecosystem. *Environmental Pollution*, 327: 121498.
- Hermann M, Polazzo F, Cherta L, Crettaz-Minaglia M, García-Astillero A, Peeters ETHM, Rico A, Van den Brink PJ, 2024. Combined stress of an insecticide and heatwaves or elevated temperature induce community and food web effects in a Mediterranean freshwater ecosystem. *Water Research*, 260: 121903.
- Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J, Gao G, 2015. GSDB 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8): 1296–1297.
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K, 2007. Wolf psort: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(Suppl. 2): W585–W587.
- Jin J, Zhao M, Wang Y, Zhou Z, Wan F, Guo J, 2020. Induced thermotolerance and expression of three key Hsp genes (Hsp70, Hsp21, and sHsp21) and their roles in the high temperature tolerance of *Agasicles hygrophila*. *Frontiers in Physiology*, 10: 1593.
- Ju-Ngam T, McMillan N, Yoshimizu M, Kasai H, Wongpanya R, Srisapoom P, 2021. Functional and stress response analysis of heat shock proteins 40 and 90 of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under temperature and pathogenic bacterial exposure stimuli. *Biomolecules*, 11(7): 1034.
- Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL, 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8): 907–915.
- Kovaka S, Zimin AV, Pertea GM, Razaghi R, Salzberg SL, Pertea M, 2019. Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biology*, 20(1): 278.
- Lee H, Calvin K, Dasgupta D, Krinner G, Mukherji A, Thorne P, Park Y, 2023. Climate change 2023: Synthesis report, summary for policymakers. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland, March 19, 2023.
- Li H, Li S, Chen J, Dai L, Chen R, Ye J, Hao D, 2022. A heat shock 70 kD protein MaltHSP70-2 contributes to thermal resistance in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae): Quantification, localization, and functional analysis. *BMC Genomics*, 23(1): 646.
- Li S, Yang H, Duan Y, Wu L, Hu C, Yu B, Zhao Y, 2025. Role of heat shock proteins in response to temperature stress and their effect on apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 306(Pt 1): 141320.

- Liu C, Li J, Yan L, Zhu Y, Li Z, Cao C, Wang Y, 2025. Integrated mRNA and miRNA omics analyses reveal transcriptional regulation of the tolerance traits by *Aquatica leii* in response to high temperature. *Insects*, 16(3): 316.
- Liu Y, Zou K, Wang T, Guan M, Duan H, Yu H, Wu D, Du J, 2024a. Genome-wide identification and analysis of family members with juvenile hormone binding protein domains in *Spodoptera frugiperda*. *Insects*, 15(8): 573.
- Liu Z, Li C, Yang W, Wu Q, Xiao W, Zhu Y, Wei Q, Dong Z, Zhang G, Lu C, Pan M, Chen P, 2024b. The *Bombyx mori* singed gene is involved in the high-temperature resistance of silkworms. *Insects*, 15(4): 264.
- Ma CS, Ma G, Pincebourde S, 2021. Survive a warming climate: Insect responses to extreme high temperatures. *Annual Review of Entomology*, 66: 163–184.
- Mei Y, Jing D, Tang S, Chen X, Chen H, Duanmu H, Cong Y, Chen M, Ye X, Zhou H, He K, Li F, 2022. InsectBase 2.0: A comprehensive gene resource for insects. *Nucleic Acids Research*, 50(D1): D1040–D1045.
- Mistry J, Finn RD, Eddy SR, Bateman A, Punta M, 2013. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic Acids Research*, 41(12): e121.
- Neven LG, 2000. Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology*, 21(1): 103–111.
- Pérez-Hernández CX, Gutiérrez Mancillas AM, Del-Val E, Mendoza-Cuenca L, 2023. Living on the edge: Urban fireflies (Coleoptera, Lampyridae) in Morelia, Michoacán, Mexico. *PeerJ*, 11: e16622.
- Ritossa F, 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12): 571–573.
- Stamperna K, Giannoulis T, Dovolou E, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS, 2021. Heat shock protein 70 improves in vitro embryo yield and quality from heat stressed bovine oocytes. *Animals*, 11(6): 1794.
- Subramanian B, Gao S, Lercher MJ, Hu S, Chen WH, 2019. Evolview v3: A webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W270–W275.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S, 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Turan M, 2023. Genome-wide analysis and characterization of HSP gene families (HSP20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90) in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*) (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, 23(6): 27.
- Wang J, Que SQ, Liu X, Jin M, Xin TR, Zou ZW, Xia B, 2021. Characteristic and expression of Hsp70 and Hsp90 genes from *Tyrophagus putrescentiae* and their response to thermal stress. *Scientific Reports*, 11(1): 11672.
- Wang TH, Wu YX, Wu YY, Li XX, Liu MY, Yang LL, Li JP, Zhang ZS, Cao F, Zhong XT, Wang ZQ, 2023. Genome-wide identification and expression analysis of the GRAS gene family in response to cold stress in *Chrysanthemum nankingense*. *Horticultural Plant Journal*, 50(4): 815–830. [王同欢, 吴雨馨, 武艺圆, 李鑫鑫, 刘梦阳, 杨莲莲, 李佳鹏, 张忠山, 曹访, 仲雪婷, 王占旗, 2023. 菊花脑 GRAS 家族鉴定及其低温胁迫响应表达分析. 园艺学报, 50(4): 815–830.]
- Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Gonzales NR, Gwadz M, Lu S, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yang M, Zhang D, Zheng C, Lanczycki CJ, Marchler-Bauer A, 2023. The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1): D384–D388.
- Weaving H, Terblanche JS, Pottier P, English S, 2022. Meta-analysis reveals weak but pervasive plasticity in insect thermal limits. *Nature Communications*, 13(1): 5292.
- Woolway RI, Jennings E, Shatwell T, Golub M, Pierson DC, Maberly SC, 2021. Lake heatwaves under climate change. *Nature*, 589(7842): 402–407.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF, 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology*, 112: 531–552.
- Xu Y, Shi F, Li Y, Zong S, Tao J, 2022. Genome-wide identification and expression analysis of the Hsp gene superfamily in Asian long-horned beetle (*Anoplophora glabripennis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 200: 583–592.
- Yang CL, Meng JY, Zhou JY, Zhang JS, Zhang CY, 2024. Integrated transcriptomic and proteomic analyses reveal the molecular mechanism underlying the thermotolerant response of *Spodoptera frugiperda*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264(Pt 1): 130578.
- Yang XJ, Zheng HL, Liu YY, Li HW, Jiang YH, Lin LB, Deng XY, Zhang QL, 2020. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Aquatica leii* (Coleoptera: Lampyridae) under five different experimental conditions. *Frontiers in Physiology*, 11: 555233.
- Yang Z, Bielawski JP. 2000. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends in Ecology & Evolution*, 15: 496–503.
- Zhang QL, Jiang YH, Dong ZX, Li HW, Lin LB, 2021. Exposure to benzo[a]pyrene triggers distinct patterns of microRNA transcriptional profiles in aquatic firefly *Aquatica wuhana* (Coleoptera: Lampyridae). *Journal of Hazardous Materials*, 401: 123409.
- Zheng HY, Qin PH, Yang K, Liu TX, Zhang YJ, Chu D, 2022. Genome-wide identification and analysis of the heat-shock protein gene superfamily in *Bemisia tabaci* and expression pattern analysis under heat shock. *Insects*, 13(7): 570.