

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16133

温度胁迫对皱纹盘鲍生理和生化活动的影响

姜妮妮^{1,2,3}, 方建光^{3,4}, 李加琦^{3,5}, 蒋增杰^{3,4}, 毛玉泽^{3,5}, 杜美荣^{3,4},
高振琨³, 陈琼琳³

1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071;
2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
4. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
5. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 为探讨温度胁迫下皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)的响应机制, 采用室内控温实验, 通过设置 4 个温度梯度(5℃、10℃、20℃和 25℃), 设计温度骤变处理组(皱纹盘鲍从 15℃暂养温度直接转移至各实验温度)和温度缓变处理组(0.5℃/12 h), 分析温度剧烈变化和温度缓慢变化对皱纹盘鲍耗氧率和排氨率的影响及其差异性; 并对高温和低温处理下皱纹盘鲍消化腺中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)和溶菌酶(LSZ)活性的变化情况以及不同组织(血细胞和肌肉组织)中 Cu/Zn-SOD 基因的表达状况进行了研究。结果表明, 皱纹盘鲍耗氧率和排氨率随海水温度的升高而增加, 20℃达到最高值; 25℃骤变处理组与缓变处理组耗氧率和排氨率间存在极显著差异($P<0.01$)。5℃和 10℃骤变处理组皱纹盘鲍氧氮比(O/N)同缓变处理组间存在极显著差异($P<0.01$)。在高温胁迫后的 3 h, 消化腺中 SOD、CAT 和 LSZ 活性达到最高, 而 ACP 活性在胁迫 6 h 后达到最高($P<0.01$); 低温胁迫显著降低皱纹盘鲍 LSZ 的活性, 于胁迫 9 h 后达到最低($P<0.01$)。不同温度胁迫下, 皱纹盘鲍血细胞和肌肉组织中 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量均表现上调, 与对照组存在显著差异性($P<0.05$)。本研究表明, 温度胁迫能显著影响皱纹盘鲍的生理和生化活动, 这将有助于探讨皱纹盘鲍夏季高死亡率的原因, 为皱纹盘鲍健康养殖提供一定的理论依据。

关键词: 皱纹盘鲍; 温度; 生理和生化活动; Cu/Zn-SOD 基因

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)02-0220-11

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)为冷水性海洋生物, 自然分布于中国辽东与山东半岛、朝鲜半岛和日本半岛北部, 是鲍科最有经济价值的种类之一^[1]。随着水产养殖技术的成熟与完善, 皱纹盘鲍已在中国山东和辽宁两省大规模养殖, 并取得了良好的经济效益。然而, 环境恶化、种质退化以及病害多发等问题已严重影响了鲍产业的发展^[2-3]。影响贝类健康养殖的主要环境因素包括温度、盐度和重金属等^[4-5]。海水温度能直接影

响贝类的存活率、代谢活动和生长发育^[6-7]。徐东等^[8]根据獐子岛海域虾夷扇贝筏式养殖区夏季水温变化情况, 研究了不同温度胁迫方式对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)耗氧率和排氨率的影响, 结果发现, 水温剧烈变化严重影响虾夷扇贝的生理活动, 导致其代谢紊乱。Cotter 等^[9]指出, 夏季海水温度升高和水体富营养化是导致太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)大量死亡的主要原因。温度变化, 特别是温度急剧变化会严重影响贝类的

收稿日期: 2016-04-22; 修订日期: 2016-05-28.

基金项目: 国家贝类产业技术体系项目(CARS-48).

作者简介: 姜妮妮(1989-), 女, 博士研究生, 主要从事贝类养殖生态学研究. E-mail: sdnujiangweiwei@163.com

通信作者: 方建光, 研究员. E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn

生理活动、免疫功能和抗病能力, 从而导致贝类因免疫抑制而死亡^[10]。因此, 探究温度与贝类生理和生化活动的关系对于预防养殖贝类病害具有至关重要的意义。

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是贝类抗氧化防御系统中的重要酶, 能够增强贝类吞噬细胞的防御功能和免疫能力, 保护机体免受活性氧(ROS)自由基的损伤^[11-12]。酸性磷酸酶(ACP)和溶菌酶(LSZ)是贝类非特异性免疫系统中的重要组成部分, 兼有分解和防御的双重功能^[10]。关于温度影响海洋贝类的抗氧化防御系统和免疫系统的研究, 国内外已有较多相关报道。Hao 等^[13]以虾夷扇贝为研究对象, 探讨了高温胁迫对虾夷扇贝抗氧化能力的影响。Liu 等^[14]发现, 25℃高温胁迫能显著提高海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)的活性。贾艳丽等^[15]还发现, 高温胁迫下皱纹盘鲍幼鲍肌肉组织中 SOD、ACP 和 LSZ 的活性显著升高。而关于皱纹盘鲍成体响应温度急剧变化的研究则鲜见报道。

按结合金属离子的不同, SOD 主要分为 3 大类, 即 Mn-SOD、Fe-SOD 和 Cu/Zn-SOD, 其中 Cu/Zn-SOD 在生物有机体内广泛存在, 是目前研究最多的一种超氧化物歧化酶^[16]。关于 Cu/Zn-SOD 基因的研究在很多贝类中均有过相关的报道。姜冰等^[16]克隆了虾夷扇贝 Cu/Zn-SOD 基因的 cDNA 全长, 并对该基因在不同组织、不同发育阶段的表达状况进行了研究。Bao 等^[17]克隆了海湾扇贝 Cu/Zn-SOD 基因, 并证实了 Cu/Zn-SOD 在免疫防御中发挥着重要作用。Boutet 等^[18]和 Li 等^[19]分别研究了不同胁迫条件下 Cu/Zn-SOD 基因在太平洋牡蛎、菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*)中的表达、活性及作用。但关于温度胁迫条件下皱纹盘鲍不同组织中 Cu/Zn-SOD 基因表达情况的研究至今尚不多见。

本研究采用室内受控实验, 对比研究了温度剧烈变化和温度缓慢变化对皱纹盘鲍呼吸和排泄等生理活动的影响; 测定了在温度剧烈改变后皱纹盘鲍消化腺中 SOD、CAT、ACP 和 LSZ 活性的动态变化; 同时对皱纹盘鲍血细胞和肌肉组织中

Cu/Zn-SOD 基因的差异表达情况进行了研究; 以了解温度胁迫下皱纹盘鲍的响应机制, 为皱纹盘鲍健康养殖提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的皱纹盘鲍(壳长 4.64 cm±0.41 cm)取自山东荣成市寻山集团有限公司。清除皱纹盘鲍表面的附着生物后, 暂养于荣成楮岛水循环实验室控温循环水槽内(大连汇新海洋科技发展有限公司, 大连)。暂养期间海水温度为(15±0.5)℃, 盐度为 30.5, pH 为(7.95±0.20), 期间每天定量投喂新鲜海带。暂养 2 周后, 挑选健康个体用于实验。

1.2 实验设计

实验共设置 5℃、10℃、20℃和 25℃ 4 个温度梯度, 每个温度分别设置缓慢变化和急剧变化 2 种处理, 采用冷水机(HXLS 1000, 大连)控制温度。每个温度梯度均设 3 个平行组, 温度未变化组(15℃)为对照组。温度骤变处理组是将暂养在温度为 15℃海水中的皱纹盘鲍分别转移到温度为 5℃、10℃、20℃和 25℃的水槽中, 每个平行组随机取出 1~2 只皱纹盘鲍($n=5$)立即测定其耗氧率和排氨率。在温度骤变后的 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 随机取样, 每个平行组随机取出 3 只皱纹盘鲍($n=9$)用于 SOD、CAT、ACP 和 LSZ 活性的检测和 Cu/Zn-SOD 基因表达量的分析。

缓变处理组温度变化幅度为 0.5℃/12 h, 达到各预设温度并维持恒定温度 3 天后, 每个平行组随机取出 1~2 只皱纹盘鲍($n=5$)测定其耗氧率和排氨率, 而对皱纹盘鲍中 SOD、CAT、ACP 和 LSZ 的活性以及 Cu/Zn-SOD 基因的表达状况不再进行监测。

1.3 生理指标测定

溶解氧(DO)的测定采用 Winker 碘量法, NH₄-N 浓度则采用次溴酸钠氧化法测定(GB/T 12763.4-2007)。实验结束后, 测定皱纹盘鲍的壳长和壳宽(cm), 取软体部组织于 60℃下烘干至恒重。

根据实验前后水体中 DO 和 NH₄-N 浓度的变化, 按下列公式计算皱纹盘鲍的耗氧率[O, mg/(g·h)]

和排氮率[NR, $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$]:

$$\text{OR} = (\text{DO}_0 - \text{DO}_t) V / (Wt)$$

式中, DO_0 和 DO_t 为实验开始和结束时水体中 DO 含量(mg/L)的变化, V 为呼吸瓶中水体的体积(L), W 为皱纹盘鲍软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

$$\text{NR} = (N_t - N_0) V / (Wt)$$

式中, N_0 和 N_t 为实验开始和结束时水体中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量(mg/L)的变化, V 为呼吸瓶中水体的体积(L), W 为皱纹盘鲍软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

氧氮比(O/N)用皱纹盘鲍呼吸氧原子数与排出氨态氮原子数之比表示^[20], 即, O 的计量单位为 $\text{mg}(\text{O})/(\text{16 g}\cdot\text{h})$, N 的计量单位为 $\mu\text{mol}(\text{NH}_4)/(\text{10}^3 \text{ g}\cdot\text{h})$

1.4 酶活性测定

将皱纹盘鲍的消化腺组织切成小块置于玻璃匀浆器中, 每个平行组中的 3 只皱纹盘鲍消化腺混合为一个样品。向玻璃匀浆器中加入 $0.01 \text{ mol}/\text{L}$ 的 PBS 缓冲液(pH 6.4), 冰上匀浆, 匀浆液以 4°C 10000 g 离心 30 min, 弃沉淀, 取上清液于 -80°C 保存备用。SOD、CAT、ACP 和 LSZ 活性以及蛋白质含量采用南京建成生物研究所生产的试剂盒进行测定, 具体方法参见试剂盒使用说明。

1.5 Cu/Zn-SOD 基因表达量测定

1.5.1 样品采集 灭菌刀片切开皱纹盘鲍的腹足, 用 1 mL 无菌注射器吸取渗出的蓝色血淋巴, 每个平行组中的 3 只皱纹盘鲍血淋巴混合为一个样品。混合血淋巴以 4°C 1100 g 离心 10 min, 弃上清, 血细胞沉淀中加 1 mL Trizol(Invitrogen, USA), 涡旋振荡混匀, 于 -80°C 保存备用。同时, 迅速解剖并取皱纹盘鲍肌肉组织保存于液氮中, 用于后续 RNA 提取。

1.5.2 RNA 提取和 cDNA 合成 采用 Trizol 法提取皱纹盘鲍血细胞和肌肉组织的 RNA, 利用核酸快速定量检测仪(NanoDrop 1000, USA)检测 RNA 的含量及纯度, 琼脂糖凝胶电泳(1.2%)检测 RNA 的完整性。按照 Roche 公司 PTranscriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的使用说明, 以总 RNA 为模板, 以 oligo(dT)₁₈ 为引物, 合成 cDNA 第一链, 置 -80°C 保存备用。

1.5.3 引物设计及合成 利用 primer premier5.0 引物设计软件(<http://www.premierbiosoft.com/pri->

merde sign), 根据皱纹盘鲍 Cu/Zn-SOD 基因全长序列(GenBank Accession No.: DQ324856)设计特异性引物: SODF: 5'-TGA AAG TGA CGG GCT CCA-3'; SODR: 5'-TTG CCG AAA GGG TTG AAG T-3'; 内参基因 18S rRNA 基因的引物是基于 GenBank(Accession No. AY319437.1)的序列设计: 18S rRNAF: 5'-CAC CCG AAA GCA GCA AAC-3'; 18S rRNAR: 5'-TTC CCA GTA AGC GTC AGT CAA AC-3'。引物设计完成后, 由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.5.4 Real-time PCR 扩增将 cDNA 模板稀释 3 倍后, 按照 Roche 公司 LightCycler® 480 SYBR Green I Master 试剂盒的说明书进行操作, Real-time PCR 反应于 Roche LightCycler® 480 II 荧光定量 PCR 仪(Roche, Switzerland)上进行。反应体系($10 \mu\text{L}$)如下: Master Mix $5 \mu\text{L}$, DNA 模板 $1 \mu\text{L}$, 上下游引物($10 \mu\text{mol}/\text{L}$)各 $0.5 \mu\text{L}$, dH_2O $3 \mu\text{L}$ 。反应程序为: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 55°C 15 s, 72°C 10 s, 45 个循环。反应完成后, 实验结果采用 Real-time PCR(SYBR Green)2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 相对定量法进行分析。

1.6 数据分析

运用统计分析软件 SPSS 16.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和双因素方差分析(two-way ANOVA), $P < 0.05$ 时表示差异显著, $P < 0.01$ 时表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 温度胁迫对皱纹盘鲍耗氧率和排氮率的影响

单因素方差分析表明, 温度显著影响皱纹盘鲍的耗氧率和排氮率($P < 0.05$)。在实验温度范围内, 温度骤变处理组和温度缓变处理组皱纹盘鲍耗氧率和排氮率的总体趋势大体相同, 随着海水温度的升高而增加, 20°C 达到最高, 之后随海水温度的升高而减小(图 1)。

5°C 和 10°C 骤变处理组中耗氧率和排氮率显著低于 15°C 对照组, 而 20°C 和 25°C 骤变处理组中耗氧率和排氮率显著高于对照组($P < 0.01$)。同缓慢变化组相比, 直接转移至 20°C 和 25°C 海水中的皱纹盘鲍具有更高的耗氧率($P < 0.01$); 但同 10°C

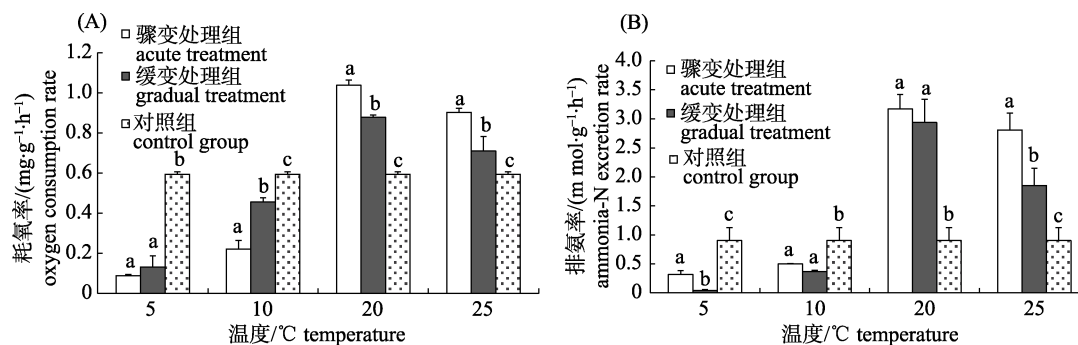


图 1 不同温度处理下皱纹盘鲍耗氧率(A)和排氨率(B)的变化

图中相同温度处理标有不同字母的数据表示相互之间差异显著($P<0.05$).

Fig. 1 The oxygen consumption rate (A) and ammonia excretion rate (B) of *Haliotis discus hannai* Ino at different temperatures. Data with different letters for the same temperature mean significant differences from each other ($P<0.05$).

缓变处理组相比, 10℃骤变处理组却具有更低的耗氧率。5℃和 25℃骤变处理组与缓变处理组间排氨率存在极显著差异($P<0.01$); 而 10℃和 20℃骤变处理组与缓变处理组间排氨率差异不显著($P>0.05$)。

不同温度处理下皱纹盘鲍氧氮比变化(O/N)见图 2。不同温度胁迫方式下, 皱纹盘鲍 O/N 比变化范围为: 15.99~77.82, 均于 10℃达到最高。5℃和 10℃骤变处理组皱纹盘鲍 O/N 比同缓变处理组间存在极显著差异($P<0.01$), 且与对照组存在显著差异($P<0.05$)。

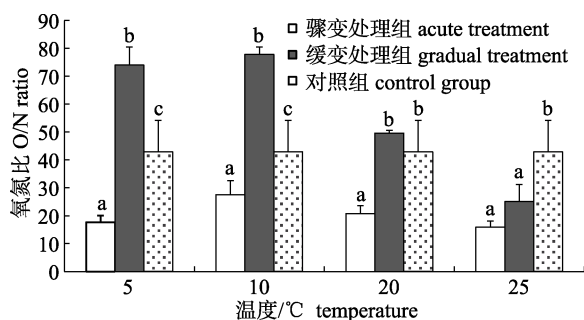


图 2 不同温度处理下皱纹盘鲍氧氮比的变化

图中相同温度处理标有不同字母的数据表示

相互之间差异显著($P<0.05$)

Fig. 2 The O/N rates of *Haliotis discus hannai* Ino at different temperatures

Data with different letters for the same temperature mean significant differences from each other ($P<0.05$).

2.2 温度胁迫对皱纹盘鲍消化腺中酶活性的影响

不同温度处理组下皱纹盘鲍消化腺中 SOD、CAT、ACP 和 LSZ 活性变化见图 3。双因素方差分析表明, 温度和时间对皱纹盘鲍消化腺中几种

酶活性变化具有交互作用($P<0.01$)。

2.2.1 超氧化物歧化酶(SOD) 不同温度处理显著影响皱纹盘鲍消化腺中 SOD 活性($P<0.05$, 图 3A)。温度升高后的 3 h、6 h、9 h 和 12 h, 皱纹盘鲍消化腺中 SOD 的活性显著高于对照组($P<0.05$), 且在温度胁迫 3 h 后达到最高(15.804 U/mgprot)。随着胁迫时间的延长, 25℃骤变处理组 SOD 的活性逐渐接近至对照组水平。在低温处理组中, 皱纹盘鲍 SOD 的活性于胁迫 9 h 时达到最低(6.657 U/mgprot), 显著低于 15℃对照组; 而在胁迫 12 h 时, 皱纹盘鲍 SOD 的活性急剧升高, 显著高于同期对照组水平($P<0.01$)。

2.2.2 过氧化氢酶(CAT) 与 SOD 活性变化趋势相似, 皱纹盘鲍消化腺中 CAT 的活性在温度急剧升高后显著上升($P<0.01$, 图 3B)。温度骤然升高后, 皱纹盘鲍消化腺中 CAT 的活性迅速升高, 3 h 时达到最高(10.437 U/mgprot), 温度急剧升高的 12 h 内, CAT 活性变化均极为显著($P<0.01$)。而 5℃骤变处理组中, CAT 的活性于胁迫 6 h 和 9 h 时显著低于对照组($P<0.01$), 随后下降的幅度逐渐变小并随时间延长趋于稳定在一定的范围内。

2.2.3 酸性磷酸酶(ACP) 不同温度处理后, 皱纹盘鲍肝胰腺中 ACP 的活性随时间变化趋势如图 3C 所示。结果表明, 温度胁迫能显著提高皱纹盘鲍肝胰腺中 ACP 的活性($P<0.01$)。

温度急剧升高后, 皱纹盘鲍 ACP 的活性于 3 h 和 6 h 明显升高, 显著高于对照组水平($P<0.01$), 且在胁迫 6 h 后达到最高, 为 538.585 U/mgprot。

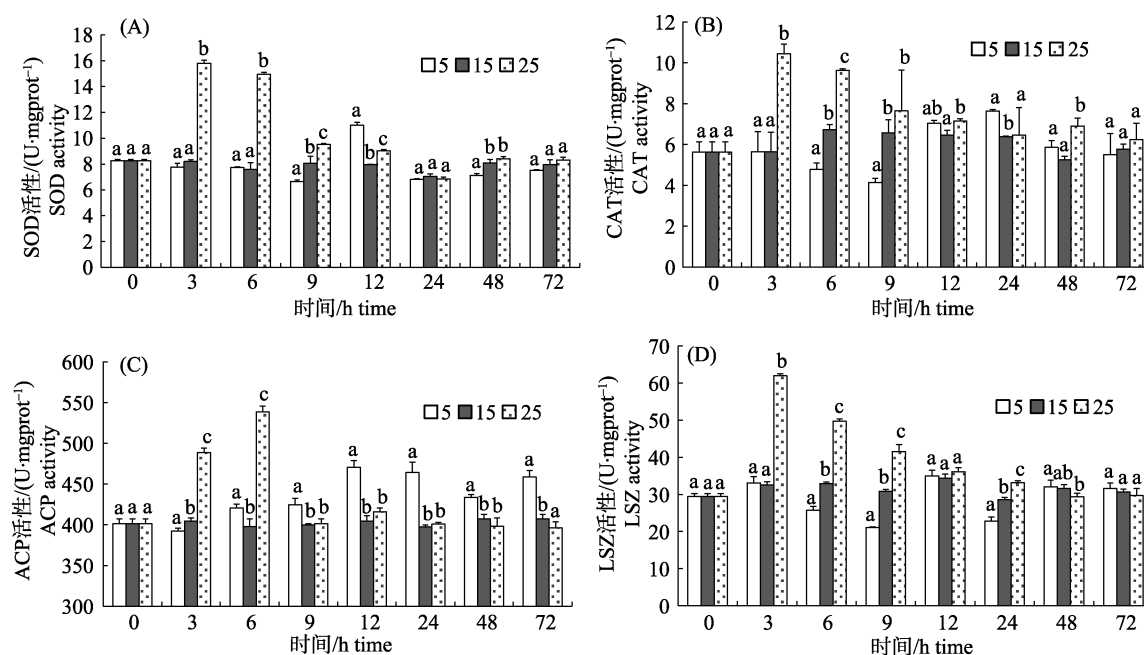


图 3 不同温度胁迫下皱纹盘鲍 SOD、CAT、ACP 和 LSZ 活性的变化

图中相同时间内标有不同字母的数据表示相互之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 SOD, CAT, ACP and LSZ activities of *Haliotis discus hannai* Ino at different temperatures
Data with different letters for the same time mean significant differences from each other ($P < 0.05$).

在高温处理后的 12 h, 皱纹盘鲍消化腺中 ACP 的活性也高于同期对照组, 但差异性并不显著 ($P > 0.05$), 随后 ACP 的活性逐渐下降至对照组水平。在 5°C 骤变处理组中, 皱纹盘鲍 ACP 的活性在胁迫 6 h 后一直处于较高水平, 与对照组存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.2.4 溶菌酶 (LSZ) 高温处理显著提高皱纹盘鲍消化腺中 LSZ 的活性, 而低温处理显著降低皱纹盘鲍 LSZ 的活性 ($P < 0.01$, 图 3D)。

温度急剧升高后的 3 h、6 h、9 h、12 h 和 24 h, 皱纹盘鲍消化腺 LSZ 的活性显著高于对照组 ($P < 0.01$), 且在高温胁迫 3 h 时达到最高 (61.962 U/mgprot)。高温胁迫 48 h 后, 25°C 骤变处理组中 LSZ 的活性与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。在低温处理组中, 皱纹盘鲍 LSZ 的活性呈现先降后升的变化趋势。温度降低后的 6 h、9 h 和 12 h, 皱纹盘鲍 LSZ 的活性明显降低, 且显著低于对照组 ($P < 0.01$), 并于胁迫 9 h 时达到最低 (6.657 U/mgprot), 随后逐渐恢复至对照组水平。

2.3 皱纹盘鲍 Cu/Zn-SOD 基因的组织表达分析
不同温度处理组下皱纹盘鲍血细胞和肌肉组

织中 Cu/Zn-SOD 基因相对表达量变化见图 4。双因素方差分析表明, 温度和时间对皱纹盘鲍 Cu/Zn-SOD 基因相对表达量的影响具有交互作用 ($P < 0.01$)。

2.3.1 温度胁迫对皱纹盘鲍血细胞 Cu/Zn-SOD 基因相对表达量的影响 皱纹盘鲍由 15°C 转移至 25°C 后, 血细胞中 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量显著提高 (图 4A, $P < 0.05$)。高温胁迫 12 h 后, Cu/Zn-SOD 基因相对表达量最高, 约为对照组的 13.79 倍, 之后 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量显著下降 ($P < 0.01$)。

在 5°C 低温胁迫组中, 皱纹盘鲍血细胞 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量在胁迫 9 h 和 12 h 出现明显增加, 分别为对照组的 2.45 倍和 3.39 倍, 同对照组存在极显著差异 (图 4A, $P < 0.01$)。随着低温胁迫时间的延长, Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量逐渐下降至较低水平。

2.3.2 温度胁迫对皱纹盘鲍肌肉组织 Cu/Zn-SOD 基因相对表达量的影响 与对照组相比, 实验组 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量在高温胁迫后的 12 h 和 24 h 显著升高 (图 4B, $P < 0.01$), 而在高温胁迫

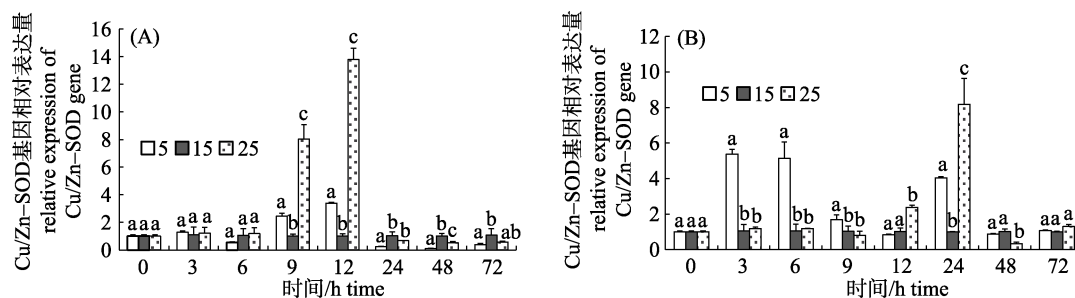


图 4 不同温度胁迫下皱纹盘鲍血细胞(A)和肌肉组织(B)中 Cu/Zn-SOD 基因的表达情况

图中相同时间内标有不同字母的数据表示相互之间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 4 The Cu/Zn-SOD gene expressions in hemocytes (A) and muscles (B) of *Haliotis discus hannai* Ino at different temperatures. Data with different letters for the same time mean significant differences from each other ($P < 0.05$).

迫后的 3 h、6 h 和 9 h 无显著变化($P > 0.05$).

皱纹盘鲍由 15°C 转移至 5°C 后, 肌肉组织中 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量显著提高(图 4B, $P < 0.05$)。低温胁迫 3 h 后, 皱纹盘鲍肌肉组织中出现 Cu/Zn-SOD 基因表达量的最高值, 为对照组的 5.38 倍, 同对照组存在极显著差异($P < 0.01$)。随后升高的幅度逐渐变小并随时间延长趋于稳定至对照组水平。

3 讨论

3.1 温度变化对皱纹盘鲍生理活动的影响

贝类属于变温动物, 温度的波动能直接影响贝类的新陈代谢活动, 进而影响其能量收支、生长发育和免疫机能^[21]。已有研究表明, 温度显著影响太平洋牡蛎^[21]、虾夷扇贝^[13]和南非鲍(*Haliotis midae*)^[20]等海洋生物的呼吸、排泄和摄食等生理活动。本研究结果表明: 皱纹盘鲍耗氧率和排氨率在实验温度范围内, 随温度升高而增加, 在 20°C 达到最高值, 之后随温度的升高而下降。这与徐东等^[8]、王俊等^[23]和毕远溥等^[24]关于虾夷扇贝、栉孔扇贝和皱纹盘鲍随温度变化的研究结果一致。皱纹盘鲍属冷水种类, 当海水温度超过 20°C 时, 会对皱纹盘鲍的呼吸代谢产生抑制作用。毕远溥等^[23]认为, 皱纹盘鲍在 20°C 左右存在着生理代谢的转变点, 当温度超过 20°C 时, 皱纹盘鲍代谢率减缓, 这与本研究结果一致。

同 25°C 缓变处理组相比, 25°C 温度骤变处理组具有更高的耗氧率和排氨率($P < 0.01$, 图 1), 意味着皱纹盘鲍在温度急剧升高后需要消耗更高的

能量, 这与徐东等^[8]的研究结果一致。海洋生物体内存在着代谢补充途径, 当外界环境温度突然升高时, 它们会通过代谢补充途径提高自身的代谢率以适应这种变化^[24]。而当皱纹盘鲍由 15°C 直接转移至 5°C 和 10°C 时, 耗氧率比缓慢变化组更低, 这可能是由于当外界温度急剧降低时, 皱纹盘鲍可能具有不同的生理响应机制应对低温胁迫, 而具体机制还有待进一步的研究。

氧氮比(O/N)是表示生物体代谢底物的一个重要指标。Mayzaud^[25]认为, 生物体完全进行蛋白质代谢时, O/N 比值较低(约为 7); 当生物体以脂肪和碳水化合物代谢为主时, O/N 比通常高于 24。本研究中, 缓变处理组皱纹盘鲍 O/N 比变化范围为 25.06~77.82, 显著高于骤变处理组($P < 0.01$, 图 2)。说明缓变处理中皱纹盘鲍以脂肪和碳水化合物代谢为主, 温度急剧变化显著降低了皱纹盘鲍脂肪和碳水化合物的代谢水平, 而提高了其蛋白质代谢水平。另外, 研究发现, 5°C 和 10°C 温度处理组皱纹盘鲍 O/N 比显著高于其他温度处理组($P < 0.01$), 说明低温会提高皱纹盘鲍脂肪和碳水化合物的代谢水平, 这与徐东等^[8]和张继红等^[26]的研究结果一致。

3.2 温度变化对皱纹盘鲍抗氧化酶体系的影响

在逆境胁迫下, 生物体内产生大量的活性氧和氧自由基, 打破了机体内活性氧代谢的平衡, 如若不及时消除会对机体造成严重的氧化损伤和免疫机能破坏^[27]。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是生物体内相互关联的 2 种抗氧化酶, 对清除体内活性氧自由基起着重要的作用^[28]。

消化腺是软体动物体内主要的抗氧化防御器官^[29], 动态监测消化腺中 SOD 和 CAT 的活性变化对判断组织的氧化损伤状况和机体的健康状况具有非常重要的价值。在本研究中, 皱纹盘鲍经受高温胁迫后的 3 h、6 h、9 h 和 12 h, 消化腺中 SOD 和 CAT 活性均显著升高($P<0.01$, 图 3A 和 3B), 随后出现不同程度的下降, 这与 Parihar 等^[30]和贾艳丽等^[15]的研究结果一致。Boveris 等^[31]研究发现, 机体耗氧率的提高能增加线粒体活性氧自由基的释放。皱纹盘鲍在经受 25℃ 高温胁迫后, 耗氧率显著提高(图 1A), 体内活性氧自由基明显增加, 机体通过增加 SOD 和 CAT 等抗氧化酶的活性清除体内过多的活性氧自由基, 使机体免受氧化损伤。石少坤^[32]研究发现, 30℃ 高温处理组中杂交鲍 SOD 和 ALP 的活性显著低于 18℃ 对照组($P<0.05$)。这可能是由于高温胁迫下, 机体产生的过多活性氧自由基已超过其承受上限, 从而导致机体抗氧化功能发生紊乱, 机体免疫力下降^[15]。皱纹盘鲍夏季高死亡率的发生可能与皱纹盘鲍的温度耐受范围有关。

研究还发现, 在低温胁迫 9 h 后, 皱纹盘鲍消化腺中 SOD 和 CAT 的活性明显降低, 显著低于对照组水平($P<0.01$)。低温胁迫后, SOD 和 CAT 等抗氧化酶活性的显著降低, 标志着机体抗氧化系统受到不同程度的损伤, 体内活性氧自由基急剧增加, 它们直接破坏细胞的生物膜系统, 造成了细胞结构和功能的严重损害, 这与王天神等^[33]的研究结果一致。从本研究结果看, 皱纹盘鲍对 5~25℃ 这一温度范围仍存在一定的耐受性。今后将进一步扩大温度范围探究皱纹盘鲍的耐受极限, 并结合本研究结果, 对皱纹盘鲍对温度胁迫的响应机制做进一步的探讨。

3.3 温度变化对皱纹盘鲍免疫酶活性的影响

酸性磷酸酶(ACP)在防御机制中直接参与磷酸基团的代谢和转移, 是机体内重要的代谢调控酶; 同时也是溶酶体的标志性酶类, 能够破坏或清除侵入机体的外来异物, 对机体起到免疫防御的作用^[34-35]。体内 ACP 的活性可通过不同程度的增加调控机体以适应外界环境条件的急剧改变。本研究中, 高温胁迫后的 3 h 和 6 h, 皱纹盘鲍中

ACP 的活性明显提高; 5℃ 骤变处理组中 ACP 的活性也在胁迫 6 h 后一直处于较高水平($P<0.01$, 图 3C)。温度急剧改变引起 ACP 活性的显著升高, 这与吴丹华等^[36]和刘石林等^[37]的研究结果一致。结合抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活性变化(图 3A 和 3B)发现, 高温胁迫可能同时诱导皱纹盘鲍启动抗氧化防御系统和免疫防御系统。随着高温胁迫时间的延长, 皱纹盘鲍体内的活性氧自由基不断积累, 皱纹盘鲍启动抗氧化防御系统(如 SOD 和 CAT 等), 通过催化过氧阳离子的歧化反应, 消除氧自由基的伤害; 同时, 机体启动免疫防御系统, 提高体内相关免疫酶(如 ACP 和 LSZ 等)的活性, 从而增强机体的免疫防御能力。

溶菌酶(LSZ)是吞噬细胞杀菌的物质基础, 具有重要的防御功能, 是衡量生物体非特异性免疫的一个重要指标, 其活性的变化受到温度、pH 和化学物质等多种因素的影响^[38-39]。Langston 等^[40]报道, 在一定温度范围内, 大西洋鲷(*Hippoglossus hippoglossus* L.)LSZ 活性随海水温度的升高而升高。姜令绪^[41]研究发现, 低温胁迫组凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)LSZ 的活性显著低于对照组, 且温度越低, LSZ 活力越低。在本研究中, 高温胁迫后的 3 h、6 h、9 h、12 h 和 24 h, 皱纹盘鲍 LSZ 的活性显著高于对照组水平; 而在低温处理后的 6 h、9 h 和 12 h, LSZ 活性显著低于对照组水平($P<0.01$, 图 3D), 这与 Langston 等^[40]和姜令绪^[41]的研究结果一致。王天神等^[33]的研究表明, 克氏原螯虾(*Procambarus clarki*)具有一个免疫临界温度范围, 在临界范围之内, LSZ 活性随着温度升高而增加; 而在临界范围之外, 机体免疫应答就会受到抑制。因此, 可以推测皱纹盘鲍也具有其相应的免疫临界温度范围。

3.4 温度变化对皱纹盘鲍 Cu/Zn-SOD 基因相对表达量的影响

SOD 家族的结构和功能相对保守, 几乎存在于所有类型的需氧细胞中^[42]。Cu/Zn-SOD 作为 SOD 家族中的重要类型, 在阻止病原微生物入侵、保护细胞免受氧化损伤等方面发挥着重要作用。机体 SOD 基因的表达量会受到多种外界因素的影响, 如病原微生物、环境污染物和温度胁迫

等^[43]。Bao 等^[17]研究发现, 鳗弧菌刺激后的 12 h, 海湾扇贝血细胞中 SOD 基因的相对表达量显著增加($P<0.05$)。Kim 等^[44]报道, 不同重金属(铜、锌和镉)胁迫下的盘鲍(*Haliotis discus discus* Reeve), 其血细胞、鳃、肌肉组织和肝胰腺中 SOD 基因的 mRNA 水平也会显著上升($P<0.05$)。本研究表明, 高温胁迫能显著提高皱纹盘鲍血细胞和肌肉组织中 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量($P<0.01$), 且在血细胞中的相对表达量最高(约为对照组的 13.79 倍, 图 4)。血细胞是贝类免疫系统重要的组成部分, 其主要的免疫功能包括细胞免疫、合成和释放多种免疫因子参与体液免疫。Cu/Zn-SOD 基因在血细胞中的高表达是与其功能相一致的。

另外, 研究发现, 皱纹盘鲍在应答高温胁迫和低温胁迫时, 血细胞和肌肉组织中 Cu/Zn-SOD 基因的相对表达量存在很大差异。这可能是由血细胞和肌肉组织的结构和功能不同所决定的, 不同组织在应答温度胁迫时可能具有不同的应答机制^[43], 具体机制还有待进一步深入探究。

以上研究结果表明, 温度剧烈变化, 特别是温度急剧升高会造成皱纹盘鲍生理活动的紊乱, 体内活性氧自由基的大量积累, 从而导致机体抗氧化酶的表达和活性增强。这一结果将有助于了解温度对皱纹盘鲍生理生化活动的影响机制, 评估不同温度胁迫条件下机体的损害程度。这对于探讨皱纹盘鲍养殖的适宜温度范围具有非常重要的参考价值。在皱纹盘鲍的实际生产中, 应注意环境因素, 特别是不同季节温度对皱纹盘鲍的影响, 定期监测机体抗氧化酶和相关免疫酶活性的变化, 以了解不同时期皱纹盘鲍的免疫状态和健康程度, 为皱纹盘鲍养殖病害进行预警和防治。

致谢: 感谢荣成市寻山集团对本研究中实验材料的提供; 并感谢荣成市楮岛水产有限公司在实验具体实施中给予的帮助。

参考文献:

[1] Shu J, Li Q, Yu R H, et al. Microsatellites Analysis on Genetic Variation Between Wild and Cultured Populations of Pacific Abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2008, 38(1): 52-58. [束靖, 李琪,

于瑞海, 等. 皱纹盘鲍野生与养殖群体微卫星标记遗传变异研究[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(1): 52-58.]

[2] Ye L, Yu K K, Wang R C, et al. The study on the pathogenic bacteria of the fester disease of cultured juvenile discus abalone[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4(4): 43-48. [叶林, 俞开康, 王如才, 等. 皱纹盘鲍幼鲍溃烂病病原菌的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(4): 43-48.]

[3] Yan J P, Liu S L. Status of culturing abalone (*Haliotis discus hannai*) and its problems and countermeasures for development in China[J]. Marine Fisheries Research, 1998, 19(1): 91-96. [燕敬平, 刘士禄. 我国鲍增养殖现状、问题与发展对策[J]. 海洋水产研究, 1998, 19(1): 91-96.]

[4] Cain T. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the clam *Rangia cuneata*[J]. Mar Biol, 1973, 21(1): 1-6.

[5] De Montaudouin X, Paul-Pont I, Lambert C, et al. Bivalve population health: multistress to identify hot spots[J]. Mar Pollut Bull, 2010, 60(8): 1307-1318.

[6] Brucet S, Boix D, Nathansen L W, et al. Effects of temperature, salinity and fish in structuring the macroinvertebrate community in shallow lakes: implications for effects of climate change[J]. PloS ONE, 2012, 7(2): e30877.

[7] Konstantinov A S, Pushkar V Y, Aver'yanova O V. Effects of fluctuations of abiotic factors on the metabolism of some hydrobionts[J]. Biol Bull Russ Acad Sci, 2003, 30(6): 610-616.

[8] Xu D, Zhang J H, Wang W Q, et al. Effects of temperature elevation on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 1101-1106. [徐东, 张继红, 王文琪, 等. 温度变化对虾夷扇贝耗氧率和排氨率的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1101-1106.]

[9] Cotter E, Malham S K, O'Keeffe S, et al. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis[J]. Aquaculture, 2010, 303(1-4): 8-21.

[10] Xu Y Q, Wu W J, Jiang W M, et al. Effect of temperature on immune system and the mechanism in shellfish[J]. Fisheries Science, 2012, 31(3): 176-180. [许友卿, 吴卫君, 蒋伟明, 等. 温度对贝类免疫系统的影响及其机理研究进展[J]. 水产科学, 2012, 31(3): 176-180.]

[11] Fei L H, Shao Y Q, Li Y. Comparative analysis of the activity of SOD, CAT and MPO in different tissues of the scallop *Chlamys farreri*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2008(3): 128-132. [费来华, 邵雁群, 李赟. 栉孔扇贝不同组织 SOD、CAT 和 MPO 活力的比较分析[J]. 海洋湖沼通报, 2008(3): 128-132.]

- [12] Nagalakshmi N, Prasad M N V. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: protective role of free radical scavengers[J]. B Environ Contam Tox, 1998, 61(5): 623–628.
- [13] Hao Z L, Tang X J, Ding J, et al. Effect of high temperature on survival, oxygen consumption, behavior, ammonia–N excretion, and related immune indicators of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*[J]. Aquacult Int, 2014, 22(6): 1863–1876.
- [14] Liu S L, Jiang X L, Hu X K, et al. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904)[J]. Aquac Res, 2004, 35(7): 678–682.
- [15] Jia Y L, Wang J Y, Sun J F. Effects of high temperature stress on immune factors of young *Haliotis discus hannai* Ino[J]. Advances in Marine Science, 2015, 33(3): 367–373. [贾艳丽, 王江勇, 孙敬锋. 高温胁迫对皱纹盘鲍幼鲍免疫因子的影响[J]. 海洋科学进展, 2015, 33(3): 367–373.]
- [16] Jiang B, Bao X B, Zhang M, et al. Cu/Zn superoxide dismutase and Its transcription expression analysis in *Mizuhopecten yessoensis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 12: 150–156. [姜冰, 鲍相渤, 张明, 等. 虾夷扇贝铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与转录表达特性分析[J]. 生物技术通报, 2011, 12: 150–156.]
- [17] Bao Y B, Li L, Wu Q, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of extracellular copper/zinc superoxide dismutase gene from bay scallop *Argopecten irradians*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 17–25.
- [18] Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions[J]. Gene, 2004, 329: 147–157.
- [19] Li C H, Sun H I, Chen A Q A, et al. Identification and characterization of an intracellular Cu, Zn-superoxide dismutase (icCu/Zn-SOD) gene from clam *Venerupis philippinarum*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(3): 499–503.
- [20] Vosloo D, Vosloo A. Response of cold-acclimated, farmed South African abalone (*Haliotis midae*) to short-term and long-term changes in temperature[J]. J Therm Biol, 2010, 35(7): 317–323.
- [21] Li Z M, Liu Z G, Xie L, et al. Oxygen Consumption and ammonia–N excretion rates of *Crassostrea rivularis*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2011, 31(1): 28–33. [栗志民, 刘志刚, 谢丽, 等. 近江牡蛎耗氧率和排氨率的研究[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(1): 28–33.]
- [22] Wang J, Jiang Z H, Zhang B, et al. Study on physiological energetics of Farrer's scallop (*Chlamys farreri*)[J]. Marine Fisheries Research, 1999, 20(3): 71–75. [王俊, 姜祖辉, 张波, 等. 栉孔扇贝生理能量学研究[J]. 海洋水产研究, 1999, 20(3): 71–75.]
- [23] Bi Y B, Jiang S, Liu H Y, et al. Effect of temperature and weight on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Haliotis discus hannai*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2000, 6(5): 444–446. [毕远溥, 蒋双, 刘海映, 等. 温度、体重对皱纹盘鲍耗氧量和排氨量的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(5): 444–446.]
- [24] Tian X, Dong S L, Wu F, et al. The effects of temperature changes on the oxygen consumption of juvenile Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Osbeck[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2004, 310(1): 59–72.
- [25] Mayzaud P. Respiration and Nitrogen Excretion of Zooplankton. II Studies of metabolic characteristics of starved animals[J]. Mar Biol, 1973, 21(1): 19–28.
- [26] Zhang J H, Fang J G, Liang F P. Effects of low water temperature on energy budget of scallop *Chlamys farreri* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(1): 48–51. [张继红, 方建光, 梁翻鹏. 低温对栉孔扇贝能量收支的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 48–51.]
- [27] Winston G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals[J]. Comp Biochem Physiol C, 1991, 100(1–2): 173–176.
- [28] Kong X H, Wang G Z, Ai C X, et al. Comparative study on total antioxidative capability and SOD activity in different organs and tissues of mud crab *Scylla serrata*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2003, 22(4): 469–474. [孔祥会, 王桂忠, 艾春香, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中总抗氧化能力和 SOD 活性的比较研究[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4): 469–474.]
- [29] Livingstone D R, Lips F, Martinez P G, et al. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*[J]. Mar Biol, 1992, 112(2): 265–276.
- [30] Parihar M S, Javeri T, Hemnani T, et al. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature[J]. J Therm Biol, 1997, 22(2): 151–156.
- [31] Boveris A, Cadenas E, Stoppani A O M. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide[J]. Biochem J. 1976, 156(2): 435–444.
- [32] Shi S K. Studies on the immune parameters of mollusk stimulated by environmental[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [石少坤. 环境因子对贝类几种免疫因子影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [33] Wang T S, Zhou X, Zhao Z Y, et al. Effect of temperature

- change on immune enzyme activities of *Procambarus clarki*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(12): 239–241. [王天神, 周鑫, 赵朝阳, 等. 不同温度条件下克氏原螯虾免疫酶活性变化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(12): 239–241.]
- [34] Yokota Y, Nakano E. Comparative studies on particulate acid phosphatases in sea urchin eggs[J]. Comp Biochem Physiol B, 1982, 71(4): 563–567.
- [35] Li Q, Li H, Jiang C J, et al. Comparison of immune parameters in the haemolymph of white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(2): 132–135. [李强, 李华, 姜传俊, 等. 温度对凡纳滨对虾血淋巴免疫指标的影响[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(2): 132–135.]
- [36] Wu D H, Zheng P P, Zhang Y Y, et al. Effect of temperature stress on serum non-specific immune factors in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25(4): 370–375. [吴丹华, 郑萍萍, 张玉玉, 等. 温度胁迫对三疣梭子蟹血清中非特异性免疫因子的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(4): 370–375.]
- [37] Liu S L, Ru X S, Xu Q Z, et al. Effects of high-temperature stress on several immune enzyme activities of *Apostichopus japonicus* thermotolerant and normal species[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(2): 344–351. [刘石林, 茹小尚, 徐勤增, 等. 高温胁迫对刺参耐高温群体和普通群体主要免疫酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(2): 344–351.]
- [38] Möck A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution[J]. J Fish Biol, 1990, 37(6): 873–885.
- [39] Chen Y, Jiang M F, Ye Y H, et al. Advances in the study of lysozyme[J]. Journal of Biology, 2009, 26(4): 4–6. [陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 4–6.]
- [40] Langston A L, Hoare R, Stefansson M. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12(1): 61–76.
- [41] Jiang L X. Effects of environmental factors on the immune activity and antioxidant enzyme activity[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004. [姜令绪. 环境因子对甲壳动物免疫力和抗氧化酶活力的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.]
- [42] Fink R C, Scandalios J G. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other Eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases[J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 399(1): 19–36.
- [43] Zelko I N, Mariani T J, Folz R J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu, Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression[J]. Free Radical Bio Med, 2002, 33(3): 337–349.
- [44] Kim K Y, Lee S Y, Cho Y S, et al. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(5): 1043–1059.

Effects of temperature change on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino

JIANG Weiwei^{1,2,3}, FANG Jianguang^{3,4}, LI Jiaqi^{3,5}, JIANG Zengjie^{3,4}, MAO Yuze^{3,5}, DU Meirong^{3,4}, GAO Zhenkun³, CHEN Qionglin³

1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

4. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

5. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: The effects of changes in temperature on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino were studied in the laboratory to better understand the thermal tolerance mechanisms of abalone. Abalone were transferred abruptly from a rearing temperature (15°C, control temperature) to 5°C, 10°C, 20°C, or 25°C. Other groups of abalone were acclimated to different experimental temperatures (5°C, 10°C, 20°C, and 25°C) by gradually increasing or decreasing seawater temperature (0.5°C/12 h). Then, oxygen consumption and ammonia excretion rates of *H. discus hannai* Ino were measured, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase, acid phosphatase and lysozyme (LSZ) in the digestive gland were determined, and Cu/Zn-SOD gene expression levels in hemocytes and muscle were determined. The results showed that oxygen consumption and ammonia-N excretion rates of *H. discus hannai* Ino increased gradually with an increase in water temperature and peaked at 20°C. The rates of oxygen consumption and ammonia-N excretion in the 25°C-acute temperature change treatment were significantly higher than those in the gradual treatment ($P<0.01$). Moreover, significant differences in the abalone O/N ratio were observed between the acute and gradual temperature change treatments at 5°C and 10°C ($P<0.01$). SOD, catalase, acid phosphatase, and LSZ activities increased significantly in abalone exposed to high temperature (25°C) for 72 h and reached the maximum at 3 h or 6 h ($P<0.01$). However, a significant decrease in LSZ activity was found in abalone in the 5°C-acute temperature change treatment and reached the lowest level after 9 h ($P<0.01$). Significantly up regulated Cu/Zn-SOD gene expression was also observed in hemocytes and muscle in abalone from the different temperature treatments ($P<0.05$). The physiological and biochemical activities of *H. discus hannai* Ino were significantly affected by temperature. These data provide valuable insight into the possible mechanisms of abalone summer mortalities and will serve as a theoretical basis for healthy breeding of abalone.

Key words: *Haliotis discus hannai* Ino; temperature; physiological and biochemical activities; Cu/Zn-SOD gene

Corresponding author: FANG Jianguang. E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn