

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18436

高温胁迫对长牡蛎‘海大 3 号’品系存活及 5 项免疫指标的影响

孟广玮¹, 李琪^{1,2}, 徐成勋¹, 刘士凯¹

1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266200

摘要: 夏季海水温度升高会对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)体内生化反应产生重要影响, 进而影响养殖牡蛎的存活率。本研究探讨了长牡蛎‘海大 3 号’在受到温度突升和温度渐升胁迫时的高温耐受性, 以及在温度突升胁迫条件下过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LSZ)、总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)5 种相关免疫指标在 72 h 内的变化。温度渐升实验中, 实验海水的温度从 16℃逐渐升温(2℃/d)。温度突升实验中, 将长牡蛎从暂养水温(16℃)分别直接转移至 18℃、22℃、26℃、30℃和 34℃。实验结果显示, 温度渐升时长牡蛎‘海大 3 号’的最高存活温度(survival temperature maximum, STMax)为 33.63℃, 最高临界温度(critical temperature maximum, CTMax)为 40.13℃, 存活率为 50%时的温度(50% critical temperature maximum, 50%CTMax)为 36.67℃。在温度突升胁迫实验中, 72 h 的半数致死高温(median lethal temperature)72-h LT₅₀ 为 30.13℃。各实验组内脏团中 5 项相关免疫指标随时间增加变化显著。在前 12 h, CAT、SOD 及 LSZ 活性和 T-AOC 显著升高, 之后逐渐下降恢复到初始水平。MDA 含量在 6~9 h 达到最大值, 之后逐渐下降。这些结果表明高温胁迫会引起长牡蛎‘海大 3 号’体内的抗氧化免疫和溶菌酶活性发生显著变化, 进而对牡蛎的存活产生重要影响。本研究检测的高温环境的耐受能力, 将为长牡蛎新品系‘海大 3 号’的应用推广提供参考。

关键词: 长牡蛎; 高温耐受性; 存活率; CAT; SOD; LSZ; T-AOC; MDA; 海大 3 号

中图分类号: 96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)04-0738-07

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)属于广温性贝类, 一般在水温-3~32℃范围均能存活, 适宜水温为 5~28℃, 当水温超过 28℃时生长速度缓慢或停止生长^[1]。作为中国重要的海水养殖贝类, 长牡蛎具有生长快、产量高、肉质鲜美等特点, 深受广大养殖户的喜爱。然而, 近些年来, 养殖牡蛎夏季大量死亡的问题对渔业生产造成重大损失, 严重阻碍牡蛎养殖产业的发展。有研究发现高温是导致牡蛎夏季大规模死亡的重要环境因素之一^[2]。水温变化能影响海洋无脊椎动物的免疫功能, 这在日本刺参(*Apostichopus japonicus*)^[3]、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[4]和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[5]等许多物种都已经得到证实。贝类自身

的温度调节能力很弱, 体温主要受环境温度影响, 因此环境温度的改变会对其体内生理生化反应产生重要影响^[6]。急性水温变化会导致贝类体内活性氧(ROS)水平升高, 过多的 ROS 会对不饱和脂质造成损伤, 并会破坏糖类, 氨基酸, 蛋白质以及 DNA 骨架的结构^[7]。机体组织进化出了一些抗氧化防御机制来防止这些损伤, 例如一些抗氧化酶以及热休克蛋白。急性水温变化对双壳贝类免疫功能的影响在虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)^[8]、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)^[9]等物种中都有研究, 但在牡蛎鲜有报道。

在长期的长牡蛎育种实践中, 已培育出左右壳均为黑色、生长性状优良的长牡蛎‘海大 3 号’

收稿日期: 2018-12-21; 修订日期: 2019-01-18.

基金项目: 山东省农业良种工程项目(2017LZGC009); 泰山学者种业计划专家项目.

作者简介: 孟广玮(1993-), 男, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: 1453575752@qq.com

通信作者: 李琪, 教授, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

品系。本研究以长牡蛎‘海大3号’品系为素材,研究了长牡蛎‘海大3号’对升温胁迫的耐受性,分析急性水温变化对长牡蛎‘海大3号’内脏团中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LSZ)活性,总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)含量的影响,旨在探索其对高温环境的耐受能力,为长牡蛎新品系应用推广提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料的采集与暂养

本研究所使用的一龄长牡蛎‘海大3号’品系采自山东荣成桑沟湾海区。随机取500个个体[壳高: (97.33 ± 4.25) mm; 壳长: (47.21 ± 3.35) mm; 壳宽: (28.52 ± 6.82) mm; 湿重: (21.25 ± 4.54) g; $n=100$], 平均放入10个100 L水族箱中,加入过滤海水(盐度34, 温度 16°C), 暂养1周。

1.2 实验条件

1周后转移到30 L实验水族箱中,采用具有水温自动监测功能的100 W加热棒调节海水温度。实验期间保持24 h充气,每日9:00和21:00投喂螺旋藻粉制成的藻液,投喂前换水清除排泄物与剩余饵料,换水量1/3。当牡蛎离开水体后5 s内无法自主闭合时,视为死亡,发现死亡个体立即移出,以免破坏水质。

1.3 实验设计

1.3.1 温度渐升和突升的耐受性 为探讨长牡蛎对温度渐升的耐受性,随机挑选20个长牡蛎‘海大3号’个体,从 16°C 水温条件下以 $2^{\circ}\text{C}/\text{d}$ 的速度逐渐升温,盐度保持不变,每12 h观察长牡蛎存活率,实验设置3个重复组。将发现第一个牡蛎死亡时的温度记为最高存活温度(survival temperature maximum, STMax),所有牡蛎全部死亡时的温度记为最高临界温度(critical temperature maximum, CTMax),利用SPSS软件中的概率分析计算半数牡蛎存活时的温度记为50%CTMax。

为探讨长牡蛎对温度突升的耐受性,将随机挑选的20个长牡蛎‘海大3号’个体从 16°C 水温条件下直接转移至一系列较高水温(18°C 、 22°C 、 26°C 、 30°C 、 34°C)的环境中,并保持盐度不变。72 h后,观察记录各个实验组长牡蛎的存活率,实验设置

3个重复组。存活率50%的温度记为半数致死高温72-h LT_{50} (median lethal temperature)。

1.3.2 温度突升对免疫指标的影响 为研究温度突升对相关免疫指标的影响,将50个长牡蛎‘海大3号’个体从 16°C 水温条件下分别转移至 18°C 、 22°C 、 26°C 、 30°C 和 34°C 的环境中,进行72 h的温度突升胁迫,分别于0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h和72 h从每个温度梯度的水族箱中随机取3个个体用于测定相关免疫指标。

1.4 数据测定

1.4.1 组织取样与蛋白浓度测定 取长牡蛎的内脏团(所取样本为长牡蛎软体部去除鳃、闭壳肌及外套膜后的部分内脏组织,且可能包含食物残渣的消化腺部分也被去除,取样前围心腔中的体腔液事先用1 mL注射器吸出,防止影响实验结果)放于1.5 mL离心管中,立刻用液氮处理,之后放于 -80°C 冰箱保存。测定前,将冰冻的内脏团组织样品放于冰上解冻。取约500 mg组织置于1/15 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.4),冰浴条件下用匀浆机制成组织匀浆(10% w/v)。将组织匀浆在 4°C 10000 g离心30 min,取上清液 4°C 保存。上清液中蛋白浓度使用Bradford法进行测定。

1.4.2 免疫指标测定 使用南京建成生化试剂公司生产的试剂盒测定CAT、SOD、LSZ、MDA及T-AOC五项免疫指标,所有指标测定均进行3次重复。CAT活性的测定原理是基于过氧化氢酶分解 H_2O_2 的反应可通过加入钼酸铵而迅速终止,剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物,在405 nm处测定其变化量,从而可以计算出CAT的活力。将每毫克组织蛋白每秒钟分解1 μmol 的 H_2O_2 的量定义为一个CAT活力单位。SOD活性的测定原理是SOD可以专一性的抑制黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统对羟胺的氧化,减少反应生成的亚硝酸盐,后者与显色剂反应呈现紫红色,比色时根据测定管的吸光度与对照管吸光度的差值,通过计算可求出被测样品中SOD的活力。每毫克组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量定义为一个SOD活力单位。LSZ活性测定根据在一定浓度的混合菌液中,溶菌酶能水解细菌细胞壁上肽聚糖使细菌裂解而浓度降

低,透光度增强,可根据透光度变化来计算溶菌酶含量。T-AOC 的测定是根据机体中各种抗氧化物质,可将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,后者与菲啉类物质形成稳定的络合物,通过比色可以测定抗氧化能力水平。每分钟每毫克组织蛋白使反应体系吸光度值增加 0.01 定义为一个总抗氧化能力单位。MDA 可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合,生成的红色产物在 532 nm 处有最大吸收峰,通过计算可得 MDA 含量。

1.5 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析。存活率数据通过逻辑斯蒂转换建立直线回归方程,并由直线回归方程计算得到所有半数致死温度。不同实验组之间的显著性差异先进行单因素方差分析(ANOVA),然后进行 Duncan's 多重比较。显著水平为 95%($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 温度渐升和突升的耐受性

随着温度的渐升,长牡蛎‘海大 3 号’的存活率变化如图 1 所示。水温升高到 33℃时,长牡蛎开始死亡,水温达到 40℃时,长牡蛎全部死亡。在 16~30℃升温过程中,水温对长牡蛎的存活率没有显著影响($P>0.05$),在 30~42℃升温过程中,水温变化对长牡蛎存活率有显著影响($P<0.05$)。逐渐升温过程中长牡蛎‘海大 3 号’的最高存活温度 STMax 为 33.63℃,最高临界温度 CTMax 为 40.13℃,存活率为 50%时的温度 50%CTMax 为 36.67℃(表 1)。

温度突升时,72 h 内长牡蛎‘海大 3 号’存活率随时间变化如图 2。在 16℃、18℃、22℃和 26℃实验组中,72 h 内水温对长牡蛎存活率没有显著影响。30℃实验组 72 h 后长牡蛎存活率降至 55%,

34℃实验组 12 h 时长牡蛎存活率降至 61%,72 h 存活率降至 0%。72 h 的半数致死高温 72-h LT₅₀ 为 30.13℃(表 1)。

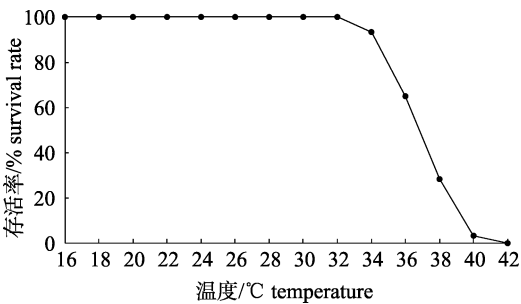


图 1 水温以 2℃/d 渐升时长牡蛎‘海大 3 号’的存活率
Fig. 1 The survival rate of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ when the water temperature was raised at 2℃/d

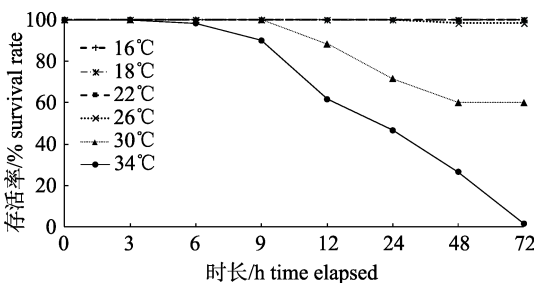


图 2 突升高温胁迫下长牡蛎‘海大 3 号’的存活率
Fig. 2 The survival rate of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ with acute high-temperature stress

当受到突升高温胁迫时,长牡蛎‘海大 3 号’对 18~26℃升温胁迫表现出较高的耐受性,存活率超过 98%,但对高于 30℃的升温胁迫耐受力较低,存活率低于 55%。在受到逐渐升温胁迫时,长牡蛎‘海大 3 号’在 33℃时开始出现死亡,36℃时死亡率超过 50%,超过 40℃时全部死亡。通过比较发现,长牡蛎‘海大 3 号’的 50% CTMax 显著高于 72-h LT₅₀,表明其对于温度突升的耐受力相比于温度渐升的耐受力更弱。

表 1 温度渐升或突升时长牡蛎‘海大 3 号’CTMax、STMax、50%CTMax 和 72-h LT₅₀
Tab. 1 The CTMax, STMax, 50%CTMax and 72-h LT₅₀ of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ when water temperature was raised gradually or abruptly

实验组 group	最高临界温度 CTMax	最高存活温度 STMax	半数存活温度 50%CTMax	72 h 半数致死温度 72-h LT ₅₀
1	40.30	33.80	36.90	30.12
2	39.70	34.20	37.00	30.09
3	40.40	32.90	36.10	30.18
$\bar{x} \pm \text{SE}$	40.13±0.38	33.63±0.67	36.67±0.49	30.13±0.05

2.2 温度突升对免疫指标的影响

图3显示了72 h急性升温胁迫对长牡蛎‘海大3号’内脏团中CAT活性的影响。急性升温胁迫3 h时, 34℃实验组CAT活性上升至34.44 U/mg prot, 显著高于其他各温度组。9~12 h时, 各实验组CAT活性达到最大值并出现显著差异, 温度高于26℃的3个实验组CAT活性显著升高, 而16℃和18℃两个实验组CAT活力值未发生显著变化。24 h时CAT活性出现显著下降, 48 h时各实验组CAT水平已恢复至初始水平。最大值出现在12 h时的26℃实验组, CAT活性达到45.81 U/mg prot。

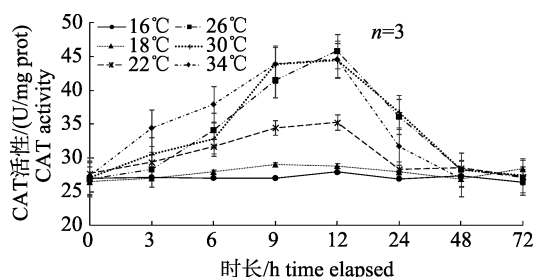


图3 水温突升时长牡蛎‘海大3号’CAT活性变化
Fig. 3 Changes in CAT activities of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ exposed to the acute water temperature increase

SOD水平随升温胁迫时间变化如图4所示。胁迫开始后12 h时, 各实验组SOD活力值出现显著差异, 26℃、30℃和34℃ 3个实验组SOD活性显著高于其他3个实验组($P<0.05$)。24~48 h各实验组SOD活性出现下降, 72 h时SOD活性水平已回归至初始水平。值得注意的是, 胁迫开始后9 h时30℃实验组SOD活力水平出现下降。

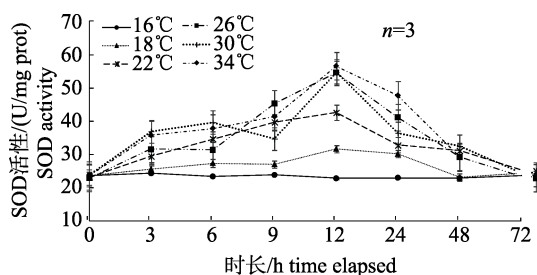


图4 水温突升时长牡蛎‘海大3号’SOD活性变化
Fig. 4 Changes in SOD activities of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ exposed to the acute water temperature increase

T-AOC水平变化情况如图5所示。6 h时, 各实验组T-AOC水平出现显著变化($P<0.05$)。6~12 h,

温度高于26℃的3个实验组T-AOC水平显著高于其他3组($P<0.05$)。说明前12 h, 26℃以上的高温胁迫对长牡蛎‘海大3号’机体总抗氧化能力产生显著影响。12~48 h, T-AOC水平出现下降。

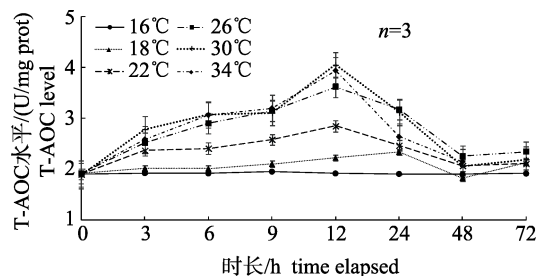


图5 水温突升时长牡蛎‘海大3号’T-AOC活性变化
Fig. 5 Changes in T-AOC activities of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ exposed to the acute water temperature increase

LSZ活性最大值出现在30℃实验组的胁迫12 h时, 达到83.49 U/mL(图6)。胁迫后6 h, 30℃和34℃实验组LSZ水平已显著高于其他各组($P<0.05$)。12 h时, 各实验组LSZ水平出现显著差异($P<0.05$), 其中22℃、26℃和30℃实验组LSZ水平达到最大值, 之后在24 h时出现显著下降。34℃实验组峰值出现在9 h时, 12 h已开始下降, 24 h时下降明显, 72 h时34℃实验组个体全部死亡, 因此没有相关数值。

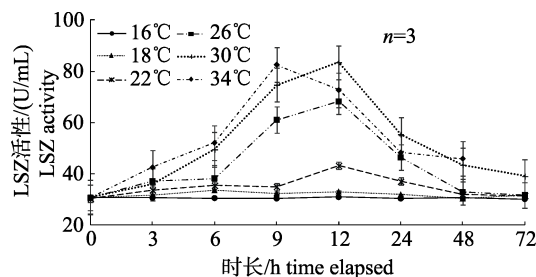


图6 水温突升时长牡蛎‘海大3号’LSZ活性变化
Fig. 6 Changes in LSZ activities of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ exposed to the acute water temperature increase

胁迫开始后3 h, 各实验组MDA含量出现显著差异($P<0.05$)(图7)。其中30℃和34℃实验组MDA含量显著高于其他实验组。6~9 h时, 30℃和34℃实验组MDA含量达到最大值并出现下降。12~24 h, 30℃和34℃实验组MDA含量显著降低($P<0.05$), 24 h后出现回升但变化不显著($P>0.05$)。22℃和26℃实验组MDA含量峰值出现在9~12 h。

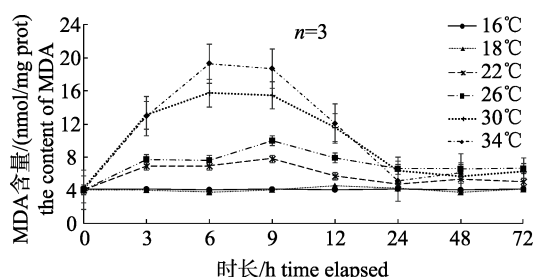


图 7 水温突升时长牡蛎‘海大 3 号’MDA 含量变化
Fig. 7 Changes in MDA content of *Crassostrea gigas* ‘Haida No. 3’ exposed to the acute water temperature increase

3 讨论

3.1 温度渐升和突升的耐受性

水温变化会对水生生物的生理反应产生重要影响,并且一定程度上决定了沿岸水生生物的分布和存活^[10]。夏季连续的高温少雨天气会导致海水温度升高,因此研究长牡蛎对高温的耐受性有助于为优化牡蛎养殖技术提供理论指导。本研究发现,温度渐升时,长牡蛎‘海大 3 号’半数致死高温(36.67℃)显著高于温度突升时半数致死温度(30.13℃),说明其对渐升高温胁迫具有更高的耐受力。类似的机体对突变因子耐受力较低的现象在其他水生动物中也早有报道。Hu 等^[11]在研究初始温度和盐度对刺参盐度耐受性影响时发现,相较于渐变盐度,突变盐度中刺参耐受范围明显缩小。相似的结果在九孔鲍^[12]、黄鳍鲷^[13]等水生生物中也得到证实。因此推测渐变的升温胁迫能为长牡蛎提供足够的适应时间,使其在生理方面做出一定的适应性反馈,从而提高了自身的耐受性;而面对突升高温胁迫,长牡蛎生理尚来不及做出适应性的反馈,导致机体稳态遭到破坏,甚至引起机体死亡。

3.2 升温胁迫对免疫指标的影响

越来越多的研究表明,环境胁迫易使机体产生更多的活性氧物质(ROS),如过氧化氢(H₂O₂)、氢氧自由基(OH⁻)、超氧阴离子自由基以及单态氧(¹O₂)等^[14]。过多的 ROS 最终可能引起机体新陈代谢紊乱甚至死亡^[15]。研究结果显示,72 h 突升高温胁迫对长牡蛎‘海大 3 号’内脏团中 CAT、SOD 及 LSZ 活性,MDA 含量和 T-AOC 有显著影响。CAT 和 SOD 作为重要的抗氧化酶类,在保持体内活性氧的代谢平衡过程中起到重要的作用。SOD

可以将超氧阴离子自由基转化为 H₂O₂ 和 O₂^[16],CAT 可以将 H₂O₂ 歧化为 H₂O 和 O₂^[17]。在温度高于 26℃ 的 3 个实验组中,高温胁迫 12 h 后,CAT 与 SOD 活性已经发生显著上升(P<0.05)。Hao 等^[8]在研究高温对虾夷扇贝存活、耗氧、行为、排氨及免疫指标的影响时发现,急性高温刺激 8 h 后,虾夷扇贝体内 CAT 和 SOD 显著上升。而温度渐变时,高温实验组最终 CAT 与 SOD 活性显著低于低温实验组。Jiang 等^[18]在研究温度变化对虾夷扇贝生理生化反应影响时发现,突升高温胁迫 12 h 后,CAT 与 SOD 活力值显著上升,同时发现随着温度上升,虾夷扇贝耗氧量随之上升。分析表明,高温胁迫导致机体耗氧量增加,引起体内 ROS 水平升高,从而激活抗氧化免疫反应,表现为 CAT 及 SOD 等抗氧化酶类活性显著升高。本研究中,高温胁迫开始后 9 h 时 30℃ 实验组 SOD 活力水平出现下降现象。分析原因可能是由于机体产生的一定量的 SOD 使得 9 h 时 30℃ 实验组 ROS 水平降低,导致 SOD 水平有所下降。然而由于 34℃ 实验组在 9~12 h 并没有出现酶活下降的情况,因此需要进一步的研究来进行探讨。总抗氧化能力(T-AOC)代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态,可以作为一种衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标。本研究中,T-AOC 水平的变化情况与 CAT 和 SOD 活性变化表现出较高的一致性。因此可以推测高温胁迫主要是通过影响 CAT 和 SOD 等抗氧化酶的产生影响长牡蛎‘海大 3 号’抗氧化免疫反应。推测突升高温胁迫会使活性氧自由基快速富集,导致抗氧化酶快速做出应答反应,表现为各种抗氧化酶活性以及总抗氧化能力显著升高。这种情况下,机体抗氧化防御机制遭到破坏,长牡蛎机体会通过一系列生理生化反应来建立新的防御体系以保持活性氧自由基含量的平衡,结果表现为 12 h 后 CAT、SOD 和 T-AOC 等抗氧化指标逐渐下降恢复初始水平。溶菌酶(LSZ)是一类具有免疫保护作用的天然抗菌肽,其活性也常被作为评估双壳贝类生理及免疫状况的指标^[19]。本研究结果显示,高温胁迫对长牡蛎‘海大 3 号’LSZ 水平具有显著影响。突升高

温胁迫产生的大量 ROS 会对机体细胞造成损伤,使得外界细菌、病毒等抗原物质更容易侵入,引起细胞内 LSZ 水平随之变化。然而高温胁迫 12 h 后,各温度组 LSZ 水平出现明显的下降,说明 LSZ 水平不仅仅由温度决定。Muona 等^[20]在进行关于大西洋鲑(*Salmo salar*)体内溶菌酶方面的研究也指出 LSZ 活性也受到机体生理生化反应的调节。丙二醛(MDA)含量可间接反映机体的活性氧自由基和脂质的过氧化水平,从而间接反映出细胞受损伤的程度^[21]。本研究结果显示急性高温胁迫会对长牡蛎‘海大3号’机体内 MDA 含量产生显著影响。MDA 含量反映了机体细胞膜中脂质的过氧化程度,高温胁迫初期,机体内 ROS 水平较高,细胞损伤产生的 MDA 水平也较高。胁迫 12 h 后 MDA 含量出现下降,推测短时间内急性升温导致长牡蛎机体受损明显,来不及免疫响应。Jiang 等^[18]对虾夷扇贝进行急性升温刺激时发现,虾夷扇贝机体 MDA 含量并未出现显著变化。而 Hao 等^[8]同样利用虾夷扇贝进行的研究表明,长时间高温刺激会导致机体 MDA 累积量显著升高。因此推测不同的实验设计可能是导致结果产生差异的重要原因,对于高温胁迫条件下,长牡蛎‘海大3号’机体内 MDA 含量在不同胁迫时长的变化规律仍需进一步进行研究。

综上所述,本研究通过突升与渐升高温胁迫两种方法,研究了长牡蛎‘海大3号’对高温胁迫的耐受能力,查明长牡蛎‘海大3号’受到突升高温胁迫时的半数致死温度为 30.13℃,明显低于渐升高温胁迫时的半数致死温度(36.67℃);高温胁迫会导致长牡蛎内脏团中 CAT、SOD、LSZ、T-AOC 以及 MDA 显著上升。研究结果为进一步探究养殖牡蛎夏季大规模死亡的成因提供了参考资料。

参考文献:

- [1] Wang R C, Wang Z P. Science of Marine Shellfish Culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008: 125-126. [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008: 125-126.]
- [2] Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, et al. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(4): 536-547.
- [3] Wang F Y, Yang H S, Gao F, et al. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(4): 491-498.
- [4] Sutuen Y, Li C C, Wenching T, et al. The protective immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature change[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(2): 271-278.
- [5] Chen M Y, Yang H S, Delaporte M, et al. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge[J]. Aquaculture, 2007, 271(1-4): 479-487.
- [6] Fearman J, Moltschanowskyj N A. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquaculture, 2010, 305(1-4): 20-25.
- [7] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 101(1): 13-30.
- [8] 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]. Aquaculture International, 2014, 22(6): 1863-1876.
- [9] Nie H T, Liu L H, Huo Z M, et al. The HSP70 gene expression responses to thermal and salinity stress in wild and cultivated Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Aquaculture, 2017, 470: 149-156.
- [10] Re A D, Diaz F, Sierra E, et al. Effect of salinity and temperature on thermal tolerance of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) (Crustacea, Penaeidae)[J]. Journal of Thermal Biology, 2005, 30(8): 618-622.
- [11] Hu M Y, Li Q, Li L. Effect of salinity and temperature on salinity tolerance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Fisheries Science, 2010, 76(2): 267-273.
- [12] Chen J C, Chen W C. Salinity tolerance of *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity and temperature levels[J]. Aquaculture, 2000, 181(1-2): 191-203.
- [13] Jian C Y, Cheng S Y, Chen J C. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*, at difference salinity and temperature levels[J]. Aquaculture Research, 2015, 34(2): 175-185.
- [14] Zhang Y, Tang H R, Luo Y. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress[J]. World Journal of Agricultural Sciences, 2008, 4(4): 458-462.
- [15] Greco L, Pellerin J, Capri E, et al. Physiological effects of

- temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia)[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(1): 132-141.
- [16] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(22): 6049-6055.
- [17] Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, 72(1): 19-66.
- [18] Jiang W W, Li J Q, Gao Y P, et al. Effects of temperature change on physiological and biochemical responses of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 463-472.
- [19] Xu Y P, Wang T T, Sun Y X, et al. Current research on function and application of aquatic animal lysozyme[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(5): 307-310. [徐永平, 汪婷婷, 孙永欣, 等. 水产动物溶菌酶研究的最新进展[J]. *水产科学*, 2011, 30(5): 307-310.]
- [20] Muona M, Soivio A. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* L.) during parr-smolt transformation[J]. *Aquaculture*, 1992, 106(1): 75-87.
- [21] Pichaud N, Pellerin J, Fournier M, et al. Oxidative stress and immunologic responses following a dietary exposure to PAHs in *Mya arenaria*[J]. *Chemistry Central Journal*, 2008, 2: 23.

Effects of high-temperature stress on survival and five immune indicators of Pacific oyster ‘Haida No. 3’

MENG Guangwei¹, LI Qi^{1,2}, XU Chengxun¹, LIU Shikai¹

1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China

Abstract: High seawater temperatures in summer have a significant effect on the biochemical responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and influence the survival rate of cultured oysters. In this study, we investigated the high temperature tolerance of *C. gigas* ‘Haida No. 3’ through exposure to acute and gradually increasing temperature stresses over 72 h, and measured changes in five immune indicators: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), lysozyme (LSZ), total antioxidant capacity (T-AOC), and malondialdehyde (MDA). In the gradual temperature increase test, we increased the seawater temperature progressively (2°C/d). In the acute seawater temperature increase test, we transferred oysters from rearing temperature (16°C) to 18°C, 22°C, 26°C, 30°C, and 34°C directly. The results showed that when the water temperature was increased gradually, the survival temperature maximum (STMax) of *C. gigas* ‘Haida No. 3’ was 33.63°C, that the critical temperature maximum (CTMax) was 40.13°C, and that the 50% critical temperature maximum (50%CTMax) was 36.67°C. In the acute water temperature increase test, the median lethal temperature after 72 h (72-h LT₅₀) was 30.13°C. In each treatment, the five immune indicators in the visceral mass changed significantly as exposure time increased. Within the first 12 h, significant increases were observed in the activities of CAT, SOD, LSZ, and T-AOC, after which their activities returned to their initial levels. The content of MDA was at its highest level between 6 h and 9 h, after which it decreased gradually. All of these results indicate that high-temperature stress induces significant changes in both the antioxidant immune response and in the activity of lysozyme in *C. gigas* ‘Haida No. 3’ and greatly influences its survival. The high temperature tolerance noted in this study will provide a reference for the application and promotion of Pacific oyster strain ‘Haida No. 3’.

Key words: *Crassostrea gigas*; high-temperature tolerance; survival rate; CAT; SOD; LSZ; T-AOC; MDA; Haida No. 3

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn