

고수온 스트레스에 반응하는 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 전사체 차등 발현 비교 분석

신은하, 박은희, 노은수, 김영옥, 남보혜

국립수산과학원

Comparative transcriptome analysis of the response of Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) after adaptive or acute heat stress condition

Eun-Ha Shin, Eun Hee Park, Eun-Soo Noh, Young-Ok Kim and Bo-Hye Nam

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

ABSTRACT

The climate change causes the mass mortality of farmed fish and shellfish. Therefore, it is important to comprehend clearly the physical and molecular mechanisms of abalone under heat stress condition. In order to find genes involved in biological response to heat stress, we have performed sequencing of transcriptome in two different group of the pacific abalone (*Haliotis discus hannai*), the breeding line group and the general aquaculture group, after adaptive treatment (18°C → 20°C → 25°C → 30°C) or acute treatment (18°C → 30°C for 0.5hr, 1hr, 3hr or 6hr). Tissue-specific differential expression genes (DEGs) were identified with 52 genes in gonad, 28 in hemocytes, 36 in gills, 31 in muscle and 33 in mantle under different heat shock conditions. There was no significantly differentially expressed pattern of transcriptome in the tested tissues between two groups, except the DEGs from the gonad tissues. Among them, the expression patterns of the *XBP1*, *OS9*, *VCP*, *SNRNP70*, *MGAT2*, *UBA5*, *DST*, *ST13*, *YOD1* and *ERP44* genes in the gonad tissue of the breeding line group showed significant differences from those of all tissues in the general aquaculture group. The present study provides a foundation for understanding the molecular mechanism of heat stress tolerance in abalone. Further functional studies should be performed on the heat stress-related genes identified in this study, which can contribute to the molecular breeding for heat stress tolerance in abalone.

Keywords: *Haliotis discus hannai*, adapted heat stress, acute heat stress, transcriptome, heat stress tolerance

서 론

전복의 성장과 발달은 온도, 산소, CO₂ 및 염분 농도와 같은 다양한 환경에 영향을 받는데, 그 중 온도는 가장 중요한 요

소로 다른 스트레스 요인과의 상관 관계가 매우 높고 특히 전복과 같이 느린 이동속도를 가지는 패류의 경우 여름철 사망률이 증가한다 (Kang *et al.*, 2019). 북방전복에 있어서 최적 수온인 20°C와의 온도 편차는 라이소자임의 활성을 억제하여 세균 감염에 대한 면역력을 감소시켜 사망률을 증가시킨다는 보고가 있다 (Ding *et al.*, 2016). 다만 전복은 점진적 수온 증가에 의한 스트레스와 달리 급격한 수온 증가에 의한 스트레스는 에너지 대사에 영향을 주지 않는다 (Ding *et al.*, 2016; Venter *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2019). 장기간 고수온에 노출되면서 에너지 대사 상태가 호기성에서 혐기성으로 전환되어 성장에 영향을 미치며 또한 이로 인한 에너지 과다 사용 및 먹이 섭취 감소로 성장률이 낮아진다 (Morash and Alter, 2016).

Received: June 22, 2021; Revised: June 25, 2021; Accepted: June 30, 2021

Corresponding author: Bo-Hye Nam

Tel: +82 (51) 720-2452, e-mail: nambohye@korea.kr
1225-3480/24791

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

수온 변화에 전복이 어떻게 반응하는지에 대한 전사체 연구는 붉은 전복 (*H. rufescens*) (Wit and Palumbi, 2013) 과 초록입술 전복 (*H. laevigata*) (Shiel *et al.*, 2015) 등의 전복 종에서 수행된 바가 있다. 그러나 이는 한반도의 여름철 고수온 평균 (28°C) 온도에서 연구되어 제한적 정보만을 제공하였다. 최근에 태평양 전복 (*H. discus*) 의 고수온 노출에 대한 생리반응의 분자 메커니즘을 이해하기 위해서 전사체 분석 연구가 보고된 바가 있다 (Chen *et al.*, 2019; Kyeong *et al.*, 2020). 전복은 온대 및 열대 해안지역에 널리 분포하지만 (Estes *et al.*, 2005) 우리나라에서 주로 양식되는 전복은 북방전복 (*H. discus hanna*) (Cook, 2014) 이다. 전복 양식생산량은 지난 10년 동안 60배 이상 증가하여 2020년의 양식생산량은 20,059 톤이며 생산 금액은 610,339 백만 원으로 천해양식어업 생산 금액의 21.02%를 차지한 주요 양식 대상종이다 (Statistics Korea 2020). 이에 전복 양식 생산성 개선을 위한 다양한 육종 연구와 분자 생물학적 연구가 진행되고 있다. 최근에는 이배체와 삼배체 전복 치패에서의 열충격 단백질 유전자의 발현 특성을 비교한 결과 삼배체 전복이 이배체 전복에 비해 더 높은 기초발현 수준을 유지하고 있는 것으로 보고되었다 (Park *et al.*, 2020). 이는 동일 고수온 자극에 노출될 경우 삼배체 전복은 이배체에 비해 상대적으로 작은 폭의 HSP유전자 발현의 변동으로도 고수온에 대응이 가능함을 시사한다.

본 연구에서는 국립수산물과학원에서 개발한 선발육종 전복과 일반 양식전복의 고수온 자극에 대한 반응을 RNA-seq으로 생산한 대량 전사체 비교로 두 집단간의 스트레스 반응 기작의 차이를 분자 생물학적으로 구명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서는 고수온 자극에 의한 집단별 반응을 비교하기 위하여 국립수산물과학원 육종연구센터에서 사육관리하고 있는 육종전복과 일반양식전복을 제공받아 사용하였다. 제공받은 전복시료는 40 리터 수조내에서 18-20°C의 흐르는 해수에 일주일간 순치시킨 후 외관상 건강한 개체 평균중량 50 g, 평균각장 62 mm, 평균각폭 45 mm, 평균각고 15 mm 를 선별하여 사용하였다.

2. 실험동물의 고수온 자극 및 RNA 추출

본 연구에서 사용된 온도별 시료의 샘플링온도는 18, 20, 25, 30°C로 결정하고 온도를 시간당 1도씩 서서히 올리면서 정해진 온도에 도달했을 때 각각 3개체씩 선별하여 혈액과 아가미 조직을 적출하였다. 시간별 시료는 실험이 진행되는 동안

수온을 30°C로 유지하면서 0.5, 1, 3, 6시간마다 각각 3개체를 임의적으로 선별하여 혈액, 아가미, 외투막, 생식소 조직을 적출하였다. 그 후 즉시 액체질소로 고정하였으며 RNA 분리를 위해 -80°C에 보관하였다. 혈액은 주사기로 채취한 후 원심분리 (4°C, 3000 rpm, 5분) 로 혈구세포만을 분리하여 액체질소에 고정한 후 다른 조직과 마찬가지로 RNA 분리를 위해 -80°C에 보관하였다. RNA 추출은 Gibco BRL사의 TRIzol을 이용하여 제조사의 실험방법에 따라 추출하였다. 그 중 일부 total RNA는 고수온 자극에 의한 시료별 유전자 발현 예비조사에 사용하기 위하여 cDNA로 합성하여 RT-PCR에 사용하였다.

3. 라이브러리 준비 및 RNA 염기서열 분석

추출한 total RNA 품질을 2100 bioanalyzer로 확인한 후, Illumina®TruSeqTMRNA Sample Preparation Kit를 이용하여 NGS분석용 cDNA 라이브러리를 구축한 후 Illumina HiSeq 2500을 사용하여 paired-end (x101) 로 염기서열 분석을 수행하였다.

4. 차등 유전자 발현 분석

생산된 전사체 서열 raw read는 Trimmomatic (ver. 0.36) (Bolger *et al.*, 2014) 을 이용하여 adaptor 및 base quality trimming ($\geq Q20$) 하여 clean read를 생산한 후, STAR 매퍼 프로그램 (ver. 2.5.1a) 을 이용하여 북방전복 참조게놈 초안 (Nam *et al.*, 2017) 에 매핑하였다. 각 전사체에 대한 발현값을 얻기 위해 RSEM (Expectation Maximization) 방법으로 RNA-Seq을 매핑하였다 (Li and Dewy, 2011).

각 조건별 (조직, 온도) 발현 변화를 보이는 유전자를 선별하기 위해 EdgeR (ver. 3.22.5) 의 Generalized linear regression 모델을 이용하여 차등 발현 유전자 (DEGs, Differentially Expressed Genes, \log_2 fold change > 4) 를 선별하여 발현 패턴 분석에 이용하였다 (McCarthy *et al.*, 2009). 다양한 온도 자극에도 불구하고 공통적으로 동일 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자를 확인하기 위해 Audic's test를 통해 조직 특이 유전자를 분석하였다.

온도자극에 직접적인 작용을 하는 유전자를 텍스트 마이닝 방식을 활용해 수집하였다. 이 때 'Heat stress', 'Heat tolerance', 'oxidative stress', 'immune' 과 같은 키워드를 이용하였다. 전복의 33,747개 모든 유전자는 ENSEMBL Human GRCh38.p1에 대해 homology 분석을 blastp (ver.2.2.31+) 를 이용하여 수행하였다. 이때, homology의 기준은 Top 1 유전자 (e-value $< 1e-5$) 로 규정하였다.

Table 1. Sequences of primers used in this study

Primer Name	Sequence	Usage
HSC70-RT-F	5'- ATGGCGCCTAAAGGAAAAGC -3'	Amplification of HSC 70 gene
HSC70-RT-R	5'- TTGTCTGCCGATCAGTCTCTT -3'	
sHSP26-RT-F	5'- ATGCTAAAGGTCGAGCAGCC -3'	Amplification of small HSP26 gene
sHSP26-RT-R	5'- GGAGAGTGAGATAGGGTCAA -3'	
RPL7-RT-F	5'- CAAGCTGAACACTCCAAACG -3'	Amplification of ribosomal protein L7 gene
RPL7-RT-R	5'- TCCACAGCACTGATGTTTCC -3'	
18s-RT-F	5'- GAGAGGGAGCATGAGAAAACG -3'	Amplification of 18s ribosomal RNA gene
18s-RT-R	5'- GACTTGCCCTCCAATAGATC -3'	

5. RT-PCR

-80°C에 보관한 각각의 샘플은 TRIzol reagent (Invitrogen) 를 사용하여 RNA를 분리하였다. 1 µg의 RNA로부터 transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics) 와 oligo (dT) primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 내재 표준 유전자로는 북방전복의 18S rRNA (accession no. AY319433) 와 RPL7 (accession no. KP698945) 를 사용하였다 (Table 1). RT-PCR 조건은 다음과 같다: Pre-denaturation 95°C, 5분; denaturation, annealing, extension 각각 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초, 35회; extension 72°C, 10분. 증폭된 PCR 산물은 EtBr (100 ng/ml) 이 섞인 1.5% 아가로스겔에 전기영동하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 주요 열충격 단백질 유전자 발현을 통한 고수온 자극 반응 조사

온도별, 고수온 노출시간별에 따른 전복의 고수온 자극 반응 여부를 확인하기 위하여 각 샘플로부터 total RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후, 주요 열충격 단백질인 HSC70과 sHSP26 유전자 (Nam *et al.*, 2013) 발현 양상을 RT-PCR로 확인하였다 (Fig. 1). 내재유전자로 사용한 RPL7과 18S rRNA 유전자는 모든 조건에서 발현이 확인되었다. HSC70과 sHSP26은 대부분의 조건 및 조직에서 육종전복과 일반양식전복에서 비슷한 발현 경향을 보였으나, 생식소 조직에서는 육종전복과 일반양식전복에서 발현 양상이 차이가 나는 것이 확인되었다. 이는 육종전복의 생식소와 일반양식전복의 생식소에서의 HSC70과 sHSP26을 포함한 열충격 단백질 및 고수온 자극에 반응하는 다른 유전자들의 차등 발현 가능성을 시사한다. RT-PCR결과에 맞추어 온도별 (18°C, 20°C, 25°C, 30°C) 및 30°C 고수온에서 노출시간별 (0.5hr, 1hr, 3hr, 6hr) 혈구 세포, 외투막, 아가미, 생식소, 근육 조직 등 총 40개의 샘플의

RNA를 RNA-seq에 사용하였다.

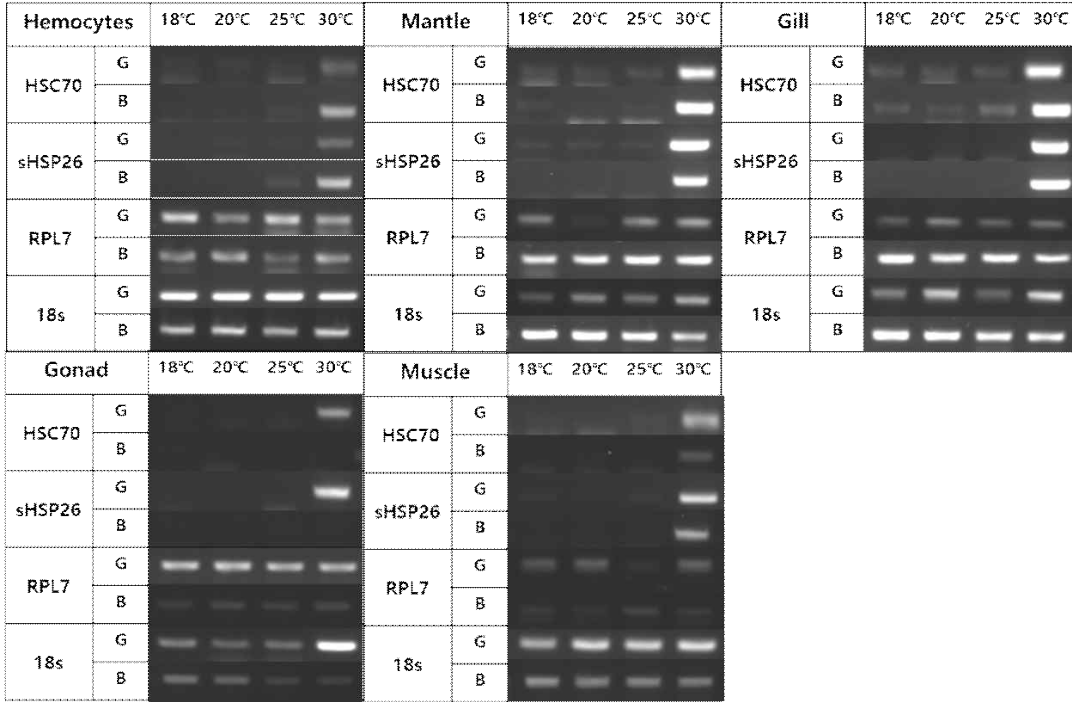
2. RNA-seq을 이용한 전사체 대량 분석

온도별 (18°C, 20°C, 25°C, 30°C) 및 고수온 (30°C) 노출시간별 (0.5hr, 1hr, 3hr, 6hr) 전복의 혈구세포, 외투막, 아가미, 생식소, 근육조직으로부터 RNA를 분리한 후 TruSeq Kit을 이용해 총 40개의 NGS용 라이브러리를 제작하여 시퀀싱하였다. 총 204.8 Gbp, 시료 당 평균 5.1 Gbp의 서열을 얻었다. 시퀀싱 과정을 위해 삽입된 adaptor 서열과 low quality 서열을 제거하여, 평균 93.68%의 clean reads를 얻었으며 북방전복 참조게놈 초안 서열에 샘플별로 매핑한 결과 평균 89.34%의 매핑률을 보였다. 각 유전자별 발현 값 (FPKM) 추정을 위해 유전자별 매핑 reads 수를 환산하였으며, 이때 40개 샘플 중 최소 한 샘플에서 매핑된 read 수가 5 이상, FPKM 0.3 이상인 유전자만을 발현된 유전자로 확인하였다. 전체 전사체 중 63.3%에 해당하는 21,348 전사체가 발현유전자로 확인되었으며 이후 분석에 이용하였다. 각 조건별, 조직별 발현유전자 변이를 대조군 (18°C) 에 대하여 pair-wise 조합 방식으로 분석하여 고수온 스트레스에 반응하는 유전자의 발현 양상 분석과 차등 발현 유전자 확보에 활용하였다.

3. 육종전복과 일반양식전복 차등 발현 유전자

육종전복과 일반양식전복의 조직별 차등 발현 유전자에 대하여 GO 분석을 수행하였다. 그 중 biological process 카테고리에서 상위 10위에 속하는 GO를 비교한 결과 육종전복과 일반양식전복의 GO term이 매우 상이함을 확인하였다 (Fig. 2). 특히 육종전복에서는 protein folding (GO:0006457) 과 protein refolding (GO:0042026) 모두 상위를 차지하고 있었으나, 일반양식전복에서는 protein refolding (GO:0042026) 만이 포함되어 있었고, 면역관련경로에 참여하는 유전자가 상위를 차지하고 있었다. 18°C를 대조군으로 하여 log2 fold change값이 2 이상인 유전자를 선별하여 차등 발현 양상을 heatmap으로 가시화하여 비교하였다. 온도변화에 따른 조직

(A)



(B)

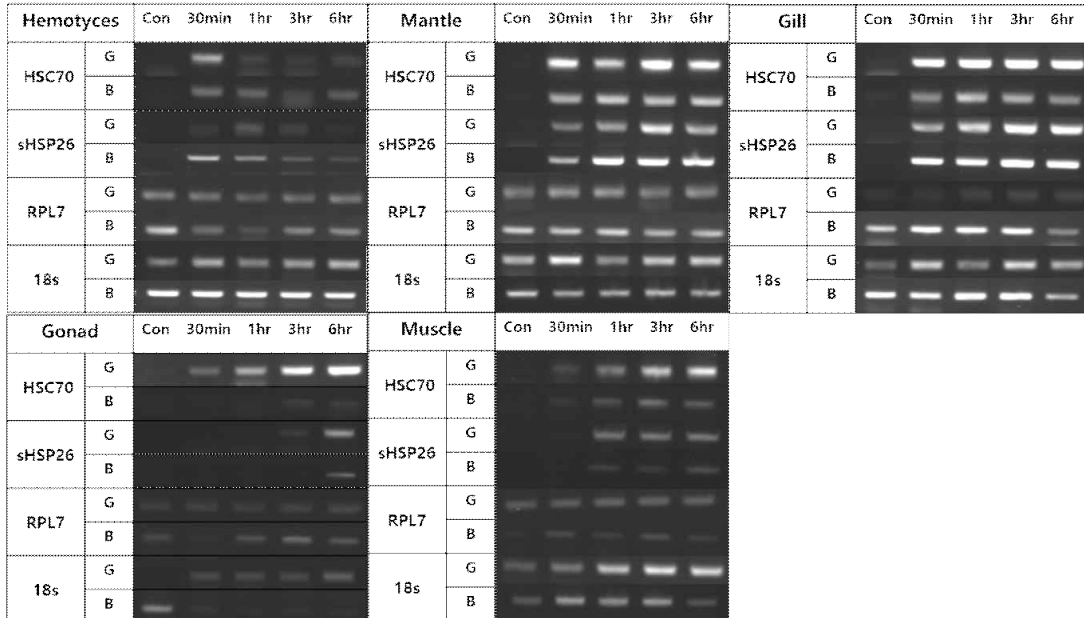


Fig. 1. RT-PCR analysis of heat-shock response genes in tissues of the general aquaculture group (G) and the breeding line group (B) under adapted heat shock (A) or acute heat shock at 30°C (B).

별 차등 발현 유전자를 확인한 결과, 생식소에서는 52개의 유전자가 온도 변화에 따라 발현의 차이를 보였으며, 혈액은 28개, 아가미는 36개, 근육은 31개, 그리고 외투막에서 33개 유전자의 차등 발현이 확인되었다 (Fig. 3). 차등 발현분석에서

도 생식소 조직에서의 열충격 단백질 유전자와 연관 단백질 유전자 발현이 육종전복과 일반양식전복에서의 차이가 뚜렷한 것이 확인되어 전복의 고수온 저항성 기전은 생식소 조직과 깊은 관련성이 예측되어, 추후 성숙속 및 생식과 관련한 분자유

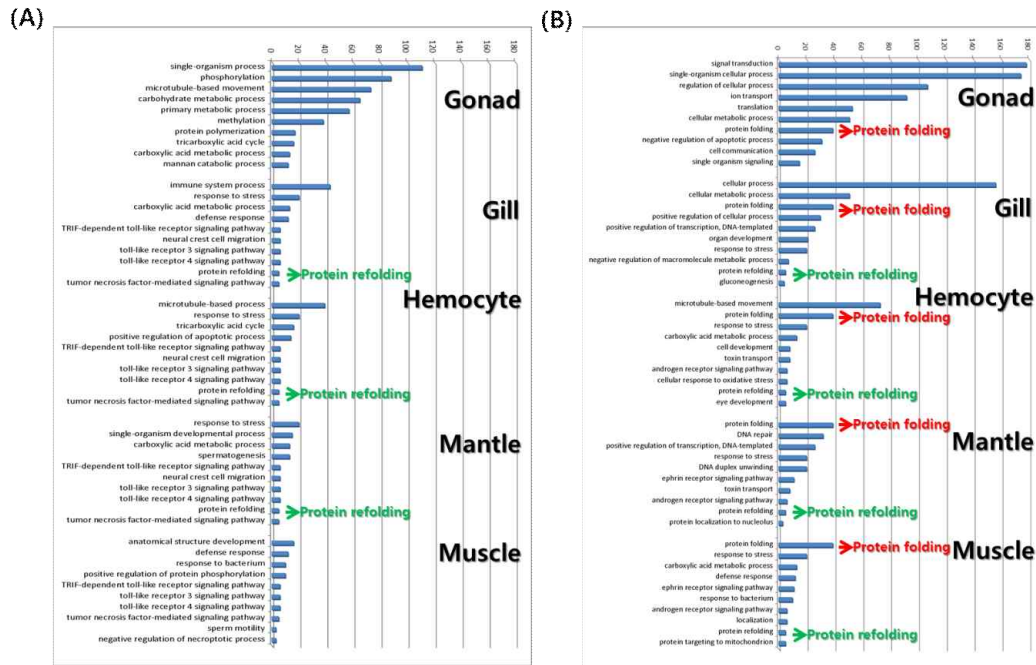


Fig. 2. Functional annotation of transcripts top 10 categorized by biological process GO terms of the general aquaculture group (A) and the breeding line group (B).

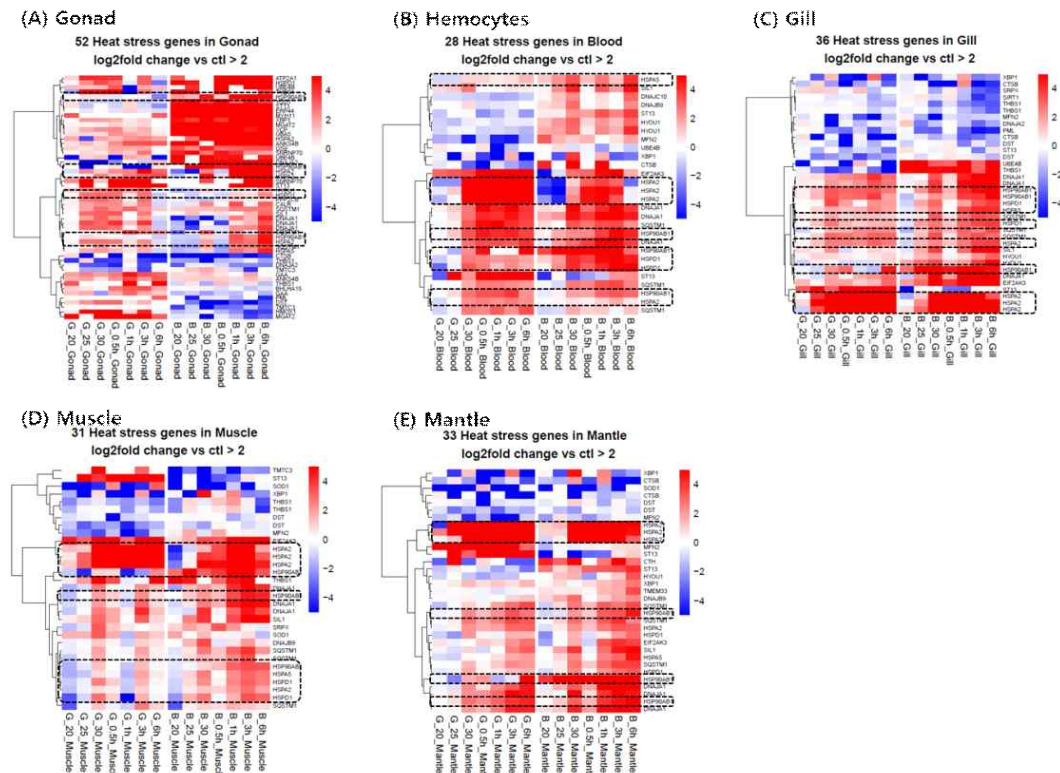


Fig. 3. Heatmap analysis of the differentially expressed genes from five different tissues of the general aquaculture group (G) and the breeding line group (B) under adaptive- or acute heat stress condition.

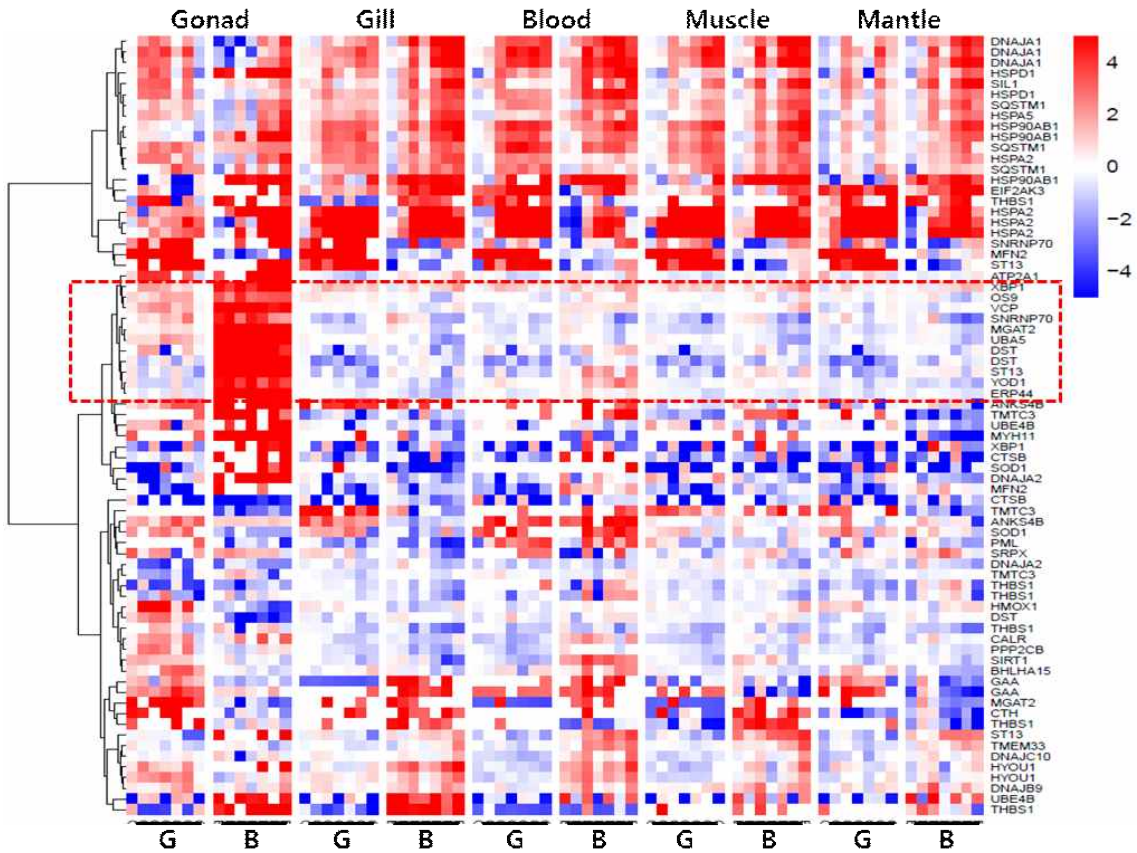


Fig. 4. Heatmap analysis of the 73 heat response genes collected from the survey of literature and Ingenuity Pathway Analysis DB. Among them, the eleven genes boxed with dotted line are showed different expression patterns in the gonad tissue between the general aquaculture group (G) and the breeding line group (B).

전학적 연구가 필요하다.

4. 육종전복과 일반양식전복의 고수온 자극 반응 차등발현 유전자 비교

고수온 자극시 세포내 항상성 유지를 위해 작용하는 유전자들을 문헌검색과, Ingenuity Pathway Analysis의 데이터베이스를 활용하여 관련 유전자 정보를 확보하였다. 이후 이들 유전자들을 대상으로 일반양식전복과 육종전복에서의 발현 변화 양상을 비교 분석하였다. 그 결과 육종전복의 생식소 조직에서 XBP1, OS9, VCP, SNRNP70, MGAT2, UBA5, DST, ST13, YOD1, ERP44 유전자의 발현 양상이 육종전복의 생식소 외 다른 조직과 일반양식전복의 모든 조직의 해당 유전자의 발현양상과 현저한 차이를 보였다 (Fig. 4, 점선 박스). 이 유전자들은 고수온 자극 시 육종전복의 생식소 세포의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 함으로써 육종전복이 일반양식전복과 비교하여 고수온을 견딜 수 있게 하는 주요 유전

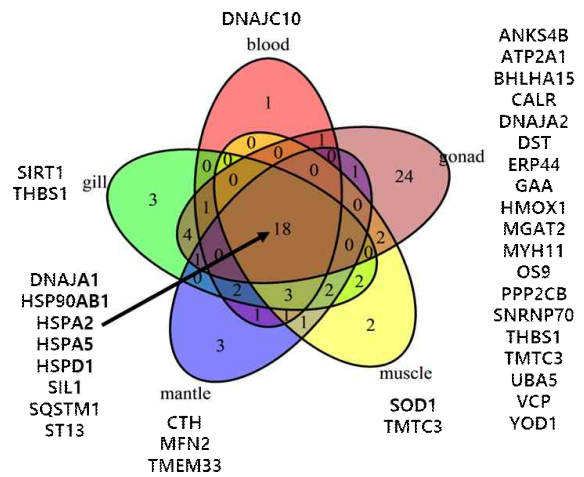


Fig. 5. Venn diagrams represent the number and genes of overlap sets of heat stress response DEGs from the five tissues.

Table 2. The list of HSP genes expressed commonly from all tested tissues in this study

Gene ID	HSP symbol	Accession No.	Identity (%)	e-value
HDSC00143CG00040	HSP90AB1	NP_001258899	76.81	0
HDSC04487CG00020	HSP90AB1	NP_001258899	77.85	1.24E-78
HDSC16686CG00010	HSP90AB1	NP_001258899	78.23	7.69E-61
HDSC02469CG00060	HSPA2	NP_068814	85.94	1.03E-74
HDSC00653CG00050	HSPA2	NP_068814	79.12	3.47E-42
HDSC01586CG00080	HSPA2	NP_068814	86.62	0
HDSC00653CG00040	HSPA2	NP_068814	85.27	3.26E-74
HDSC05236CG00010	HSPA5	NP_005338	84.09	0
HDSC04352CG00030	HSPD1	NP_955472	67.79	0
HDSC14552CG00010	HSPD1	NP_955472	61.76	1.24E-31

자인 것으로 사료된다.

5. 육종전복과 일반양식전복의 고수온 자극 반응 공통 발현 유전자 비교

육종전복과 일반양식전복에서 실험에 이용된 5개 조직 모두에서 heat stress에 반응하는 유전자 중 공통적으로 발현의 변화를 보이는 유전자를 탐색한 결과, DNAJA1, HSP90AB1, HSPA2, HSPA5, HSPD1, SIL1, SQSTM1, ST13 등 총 18개가 확인되었다 (Fig. 5), 이 중 log2 fold change 값이 2이상 Heat shock protein 유전자를 선별하였다 (Table 2). HSP90AB1 (HDSC00143CG00040, HDSC04482CG00020, HDSC16686CG00010), HSPD1 (HDSC14552CG00010)와 같이 downstream signal을 전달하는 HSP 유전자 발현이 수온 증가에 따라 일반양식전복에서는 감소하는 경향을 보이는 반면, 육종전복의 생식소에서는 특이적으로 증가하는 것이 확인되었다 (Fig. 6, 점선 박스). 이는 온도에 반응하는 유전자의 신호전달체계에 있어 상위조절 단계에서 육종전복과 일반양식전복간의 차이가 있음을 시사한다.

결론

복방전복은 우리나라에서 가장 중요한 양식 패류종이다. 그러나 기후온난화로 인한 여름철 고수온은 양식전복의 대량폐사를 야기하여 양식산업의 경제적 손실을 가져오고 있다. 이에 여름철 고수온에도 견딜 수 있는 고수온 저항성 전복 품종 개발이 절실한 상황이다. 그러므로 고수온 조건에서 전복의 생리 및 분자 메커니즘을 이해하기 위하여, 고수온 자극에 반응하는 유전자를 찾기 위해 점진적 고수온 처리 (18°C → 20°C → 30°C) 또는 급성 고수온 처리 (18°C → 30°C, 30°C에서 0.5 시간, 1시간, 3시간 6시간) 후 2개의 복방전복 그룹에서 전사체 분석을 수행하여 조직특이적, 그룹특이적 차등 발현 유전자를 분석하여 육종전복의 생식소 조직에서 유의하게 특이적으로

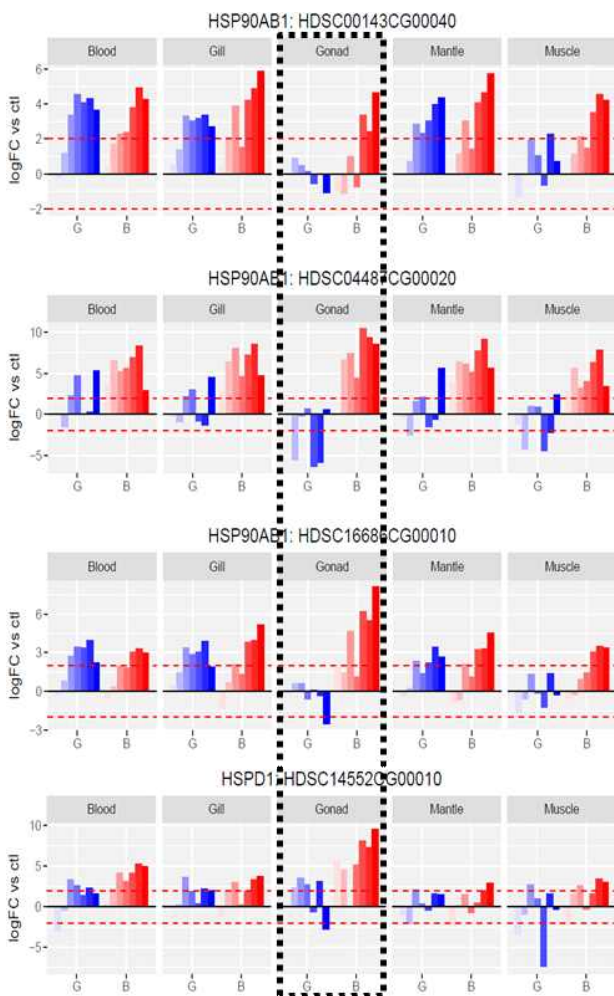


Fig. 6. Tissue-specific and differentially expressed heat shock response genes in general aquaculture group (blue) and breeding line group (red). The expression of HSP90AB1 and HSPD1 showed different expression pattern in gonad of G group and B group boxed with dotted line.

로 발현하는 유전자 군을 확인하였다. 이 중 XBP1, OS9, VCP, SNRNP70, MGAT2, UBA5, DST, ST13, YOD1, ERP44 유전자의 발현 패턴은 일반 양식군의 모든 조직과 유의미한 차이를 보였다. 본 연구는 전복의 고수온 내성 형질의 분자 메커니즘을 이해하기 위한 기초를 제공한다. 본 연구에서 확인된 고수온 반응 관련 유전자에 대해 추가적인 기능 연구가 수행되어야 하며, 이는 전복의 고수온 내성 전복품종 개발을 위한 분자유종 연구에 기여할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 국립수산물연구원 수산과학연구소사업 (R2021024)에 의해 이루어진 연구이며 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Bolger, A.M., Usadel, B. and Lohse, M. (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**: 2114-2120.
- Chen, N., Huang, Z., Lu C., Shen, Y., Luo, X., Ke, C. and You, W. (2019) Different transcriptomic responses to thermal stress in heat-tolerant and heat-sensitive Pacific abalones indicated by cardiac performance. *Front Physiol.*, **9**: 1895.
- Cook, P.A. (2014) The worldwide abalone industry. *Mod Econ.*, **5**: 1181-1186.
- Ding, J., Li, L., Wu, F. and Zhang, G. (2016) Effect of chronic temperature exposure on the immunity of abalone, *Haliotis discus hannai*. *Aquac. Res.*, **47**: 2861-2873.
- Estes, J.A., Lindberg, D.R., Wray, C. (2005) Evolution of large body size in abalones (*Haliotis*): patterns and implications. *Paleobiology*, **31**: 591-606.
- Kang, H.Y., Lee, Y.J., Song, W.Y., Kim, T.I., Lee, W.C., Kim, T.Y. and Kang, C.K. (2019) Physiological responses of the abalone *Haliotis discus hannai* to daily and seasonal temperature variations. *Sci. Rep.*, **9**: 8019.
- Kyeong, D., Kim, J., Shin, Y., Subramaniam, S., Kang, B.C., Shin, E.H., Park, E.H., Noh, E.S., Kim, Y.O., Park, J.Y. and Nam, B.H. (2020) Expression of heat shock proteins in thermally challenged Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Genes*, **11**: 22.
- McCarthy, D.J., Smyth, G.K., Robinson, M.D. (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**: 139-140.
- Morash, A.J. and Alter, K. (2016) Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Rev. Aquac.*, **8**: 342-368.
- Nam, B.H., Jung, M., Subramaniam, S., Yoo, S.I., Markkandan, K., Moon, J.Y., Kim, Y.O., Kim, D.G., An, C.M. and Shin, Y. (2016) Transcriptome Analysis Revealed Changes of Multiple Genes Involved in *Haliotis discus hannai* Innate Immunity during *Vibrio parahemolyticus* Infection. *PLoS ONE.*, **11**: e0153474.
- Nam, B.H., Park, E.M., Kim, Y.O., Kim, D.G., Jee, Y.J., Lee, S.J. and An, C.M. (2013) Analysis of heat, cold or salinity stress-inducible genes in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* by suppression subtractive hybridization. *Korean J. Malacol.*, **29**: 181-187.
- Li, B. and Dewey, C.N. (2011) RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform.*, **12**: 323.
- Park, C.J., Kim, E. J. and Nam, Y.K. (2020) Expression pattern of major heat shock protein genes in diploid and triploid abalone *Haliotis discus hannai* Juveniles. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **53**: 515-523.
- Statistics Korea (2020) Fishery production survey. Korean Statistical Information Service (KOSIS).
- Venter, L., Loots, D.T., Vosloo, A., Jansen van Rensburg, P. and Lindeque, J.Z. (2018) Abalone growth and associated aspects: now from a metabolic perspective. *Rev. Aquac.*, **10**: 451-473.