

## 붉바리(*Epinephelus akaara*) 기형 발생 치어의 형태형성 유전자 발현

유진호<sup>1</sup> · 문성희<sup>1</sup> · 오현지<sup>1</sup> · 백혜자<sup>2</sup> · 이영돈<sup>3</sup> · 이치훈<sup>4</sup> · 권준영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>선문대학교 수산생명의학과

<sup>2</sup>부경대학교 자원생물학과

<sup>3</sup>제주대학교 해양과학연구소

<sup>4</sup>주식회사 씨알

## Expression of Morphogenic Protein Genes in Juvenile Red Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*) with Deformity

Jin Ho You<sup>1</sup>, Seong Hee Mun<sup>1</sup>, Hyeon Ji Oh<sup>1</sup>, Hea Ja Baek<sup>2</sup>, Young-Don Lee<sup>3</sup>,  
Chi Hoon Lee<sup>4</sup>, Joon Yeong Kwon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

<sup>2</sup>Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>3</sup>Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

<sup>4</sup>CR Co, Ltd., Jeju 63333, Korea

### Corresponding Author

Joon Yeong Kwon

Department of Aquatic Life Medical  
Sciences, Sunmoon University, Asan  
31460, Korea

E-mail : jykwon@sunmoon.ac.kr

Received : May 29, 2019

Revised : May 30, 2019

Accepted : June 10, 2019

붉바리(*Epinephelus akaara*) 종자생산 시 기형 발생에 의한 손실이 크지만 기형어에 대한 생물학적 정보는 많지 않다. 본 연구에서는 부화 후 96일 붉바리 치어를 정상 그룹과 두 유형의 기형 그룹(머리, 턱)으로 나누어 형태형성과 연관된 4개의 주요 유전자(insulin like growth factor 1: IGF-1, bone morphogenic protein 4: BMP4, peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$ : PPAR $\gamma$ , matrix Gla protein: MGP) 발현을 조사하였다. 각 그룹에서 뇌, 간 및 근육을 잘라낸 다음 total RNA를 추출한 후 real-time PCR을 사용하여 유전자 발현 차이를 비교하였다(n=20). 부화 후 96일 붉바리 치어에서 IGF-1과 BMP4 유전자는 기형 그룹의 뇌와 간에서 정상 그룹과 비교하여 유의한 발현 차이를 나타냈다( $p < 0.05$ ). 반면에 PPAR $\gamma$ 와 MGP 유전자는 어떤 조직에서도 정상 그룹과 기형 그룹 사이에 유의한 발현 차이를 보이지 않았다. IGF-1과 BMP4 유전자는 치어 단계의 붉바리 기형 상태와 관련되어 있는 것으로 보인다.

The deformity occurring at the early developmental stage of red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) causes detrimental effects on the process of juvenile production. In this study, we have compared the expressions of several key genes (insulin like growth factor 1: IGF-1, bone morphogenic protein 4: BMP4, peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$ : PPAR $\gamma$ , matrix Gla protein: MGP) for morphogenesis between normal and 2 types (cephalic and jaw) of deformed juvenile fish. Expression of these genes were investigated in the brain, liver and muscle of each group of fish (n=20) by real-time PCR. Expression of IGF-1 and BMP4 mRNA in the brain and liver showed significant difference between normal and deformed fish ( $p < 0.05$ ). However, no difference was observed in the expression of PPAR $\gamma$  and MGP mRNA between normal and deformed fish in any tissues. It seems certain that IGF-1 and BMP4 are associated with the state of deformity in juvenile red spotted grouper.

**Keywords:** *Epinephelus akaara*(붉바리), IGF-1, BMP4, Jaw deformity(턱기형), Cephalic deformity(머리기형)



Fig. 1. Photographs of juvenile red spotted grouper with different deformity. (a) normal group (NG), (b) jaw deformity group (JDG), (c) cephalic deformity group (CDG).

## 서론

불바리(*Epinephelus akaara*)는 한국, 일본, 중국 및 베트남 등의 연안 암초지대에 주로 서식하며 맛이 좋아 고부가 가치 어종으로 각광받고 있다(Cornish, 2018). 지속적인 자원량 감소로 인해 세계 자연보전연맹(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN)은 이 종을 멸종위기 동물로 분류하였는데(Cornish, 2018), 우리나라에서는 산업적 및 생태학적 이유로 이 종의 종자생산에 대한 연구를 활발히 진행하고 있다(Lee et al., 2013). 불바리 종자생산 과정에는 타 어종과 마찬가지로 초기 골격형성 과정 중 기형 발생이 큰 문제가 된다(Yildirim et al., 2014; Park et al., 2016). 기형은 성장을 지연시키고 높은 폐사율의 원인이 되며 상품가치를 하락시키기 때문에 기형률을 낮추기 위한 노력이 필요하지만 불바리의 기형 유발 원인을 파악할 수 있는 연구는 부족하다.

바리과 어류를 포함한 해산어류의 기형은 머리(Cephalic), 척추(Vertebral), 아가미 뚜껑(Operculum) 및 턱(Jaw) 등 다양한 부위에서 관찰된다(Koumoundouros, 2010; Park et al., 2016; Kim et al., 2017). 유전적 요인 혹은 비타민 및 미네랄 등의 영양요인 그리고 수온과 같은 환경요인 등 매우 다양한 요인들이 기형을 유발할 것으로 추측되고 있지만(Boglione et al., 2013), 이 요인들과 기형과의 인과관계는 아직 명확하지 않다. 또한 불바리 종자생산 과정 중 관찰되는 기형어와 정상어가 어떠한 생물학적 차이를 갖는지, 주요 유전자의 발현 특성은 어떻게 다른지 등도 아직 밝혀져 있지 않다.

형태형성 유전자는 초기 발달 단계에서 중요한 역할을 한다. 하지만 다양한 원인으로 형태형성 유전자 경로에 문제가 생기면 유전자가 정상적으로 발현되지 못해 기형으로 발생할 수 있다(Zambonino-Infante and Cahu, 2010). 정상 개체와 기형 개체 사이에서 이 유전자들의 발현 차이가 언제까지 지속되는지, 치어 단계까지 형태형성 핵심 유전자들의 발현 차이가 계속 관찰되는지 등은 기형 발생 과정을 이해하는데 중요한 정보가 될 수 있다.

IGF-1 (Insulin like growth factor 1)은 조골세포(osteoblast)의 증식과 성숙한 조골세포의 기능을 활성화하여 성장에 영향을 미친다(Darias et al., 2011a, b). BMP4 (bone morphogenetic protein 4)는 초기 배아 발달과 뼈 연골 발달에 중요한 역할을 한다(Hogan,

1996). BMP4가 과발현되면 제브라피쉬(*Danio rerio*) 아래턱 뼈 형태의 변화가 나타나며, 다양한 조류의 부리형태 변화를 유발할 수 있다(Abzhanov et al., 2004; Albertson et al., 2005). PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptors  $\gamma$ )는 지방 조직에 주로 존재하며 지방세포의 분화에 도움을 주는 역할을 하고 조골세포 형성 억제에도 관여한다(Tontoz et al., 1994; Wan, 2010). MGP (matrix Gla protein)는 비타민-K 의존성이며  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) 잔기를 가지고 있는 단백질이며, 주로 연골세포 대사 및 무기질화에 영향을 준다(Shin and Cho, 2005; Viegas et al., 2013).

본 연구에서는 어류를 포함한 척추동물의 골격 발달과 형태형성에 영향을 주는 이 4개의 핵심 유전자(IGF-1; BMP4; PPAR $\gamma$ ; MGP)를 선택하여 치어 단계까지 성장한 불바리 정상 개체와 기형 개체 사이의 발현 특성을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 불바리 치어

기형률과 유전자 발현 조사를 위한 불바리 치어는 제주대-해양과학연구소에서 부화시켜 96일 동안 사육한 것을 이용하였다. 불바리 치어는 유수식 원형수조(지름 3.5 m  $\times$  높이 85 cm)에서 자연광주기 조건으로 사육되었으며, 사육수의 염분과 수온은 각각  $34.0 \pm 0.5$  psu,  $24.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 였다. 치어는 해산어용 배합사료를 두 시간 간격으로 공급하였다. 부화 후 96일에 원형수조에 사육중인 전 개체를 정상 개체와 기형 개체로 선별하여 기형률을 계산하였다. 그리고 선별된 정상(Fig. 1a) 및 턱기형(Fig. 1b), 머리기형(Fig. 1c) 그룹에서 각각 20마리씩을 무작위로 잡아내어 전장 및 체중을 측정 후 유전자 발현 조사에 이용하였다.

### 2. Total RNA 추출 및 real-time PCR

정상 개체(n=20), 턱기형 개체(n=20), 머리기형 개체(n=20)에서 유전자 발현을 조직별로 비교하기 위해 각 불바리 치어의 뇌, 간 및 근육을 잘라내어  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 이 조직들로부터 Trizol (ambion, USA)을 이용하여 제조사의 protocol대로 total RNA를 추출하였고, Nanodrop-2000 (Thermo, USA)을 사용하여 정량하였다.

**Table 1.** Primers to study expression of morphogenic protein genes for juvenile red spotted grouper (*Epinephelus akaara*)

Gene		Sequence	Product size	Accession number
IGF1	F	ATGTAGGGAAGGTGCGAATG	123 bp	AB902571
IGF1	R	CCTTTGTCAGCATCCTCTTTG		
BMP4	F	CTCCTGGTTACCTTTGGCC	132 bp	FJ436409
BMP4	R	ATCGCTGAAGTCCACATACAG		
PPAR $\gamma$	F	CTTCACTGTCGCATTACACAAG	130 bp	KM052849
PPAR $\gamma$	R	GTTTCTCCTCTCTGCCTGG		
MGP	F	GAACGGCCATTACAACCTTCATG	134 bp	JF430690
MGP	R	CAAAGTATCTCTGGTAGGCCTG		
$\beta$ -actin	F	ATCACACCTTCTACAACGAGC	122 bp	HQ007251
$\beta$ -actin	R	GAAGGTCTCGAATGATCTGG		

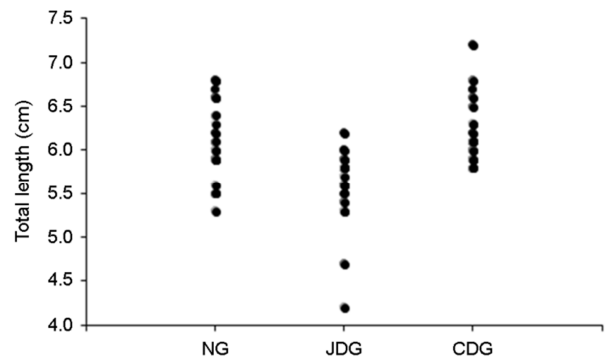
IGF-1: insulin like growth factor 1, BMP4: bone morphogenetic protein 4, PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptors gamma, MGP: matrix Gla protein,  $\beta$ -actin (reference gene)

추출된 total RNA는 TOPscript<sup>TM</sup>RT DryMIX (Enzynomics, Korea)를 사용해 cDNA로 역전사 하였다.

이 cDNA를 template로 하여, 형태형성에 영향을 주는 4개의 핵심 유전자(IGF-1; BMP4; PPAR $\gamma$ ; MGP)의 발현을 조사하기 위해 CFX96 Touch<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)과 TOPreal<sup>TM</sup> qPCR 2X PreMIX (SYBR Green With low ROX)를 사용하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. 이 때 사용된 각 유전자의 primer들은 NCBI (National Center for Biotechnology information: www.ncbi.nlm.gov) database에서 제공하는 자바리(*Epinephelus bruneus*)와 갈색등근바리(*E. coioides*)의 해당 유전자 염기서열을 근거로 Table 1과 같이 제작하였다. qRT-PCR 반응 조건으로는 initial denaturation 과정을 95°C 15분 동안 진행하였고, denaturation은 95°C에서 15초, annealing 과정은 60°C에서 15초, elongation 과정은 72°C에서 30초였으며 총 40 cycles을 실시하였다. 발현량은  $\beta$ -actin을 대조 유전자로 사용하여 상대 정량하였다.

### 3. 통계처리

유전자 발현량을 포함한 모든 결과 값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈으며, 정상 개체와 기형 개체 사이의 각 유전자 발현량 차이의 유의성은 ANOVA에 이은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검정하였다( $p < 0.05$ ). 그리고 개체 크기와 각 유전자 발현량과의 연관성을 알아보기 위해 회귀분석을 실시하였다( $p < 0.05$ ). 모든 통계처리 절차는 SPSS-통계패키지(version 18.0)를 이용하여 수행하였다.



**Fig. 2.** Size distribution (Total length, cm) of juvenile red spotted grouper with or without deformity (normal group: NG, jaw deformity group: JDG, cephalic deformity group: CDG).

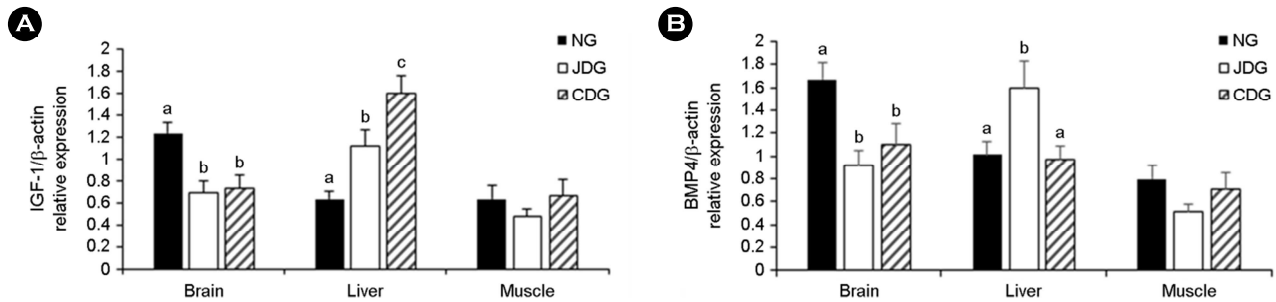
## 결 과

부화 후 96일 동안 사육한 붉바리 치어의 기형률은 21.7%였으며, 기형의 종류로는 턱기형과 머리기형이 다수를 차지하였다(Fig. 1). 붉바리 치어 정상 그룹(전장:  $6.1 \pm 0.5$  cm, 체중:  $3.6 \pm 0.7$  g) 및 턱기형(전장:  $5.6 \pm 0.5$  cm, 체중:  $2.9 \pm 0.7$  g), 머리기형 그룹(전장:  $6.2 \pm 0.4$  cm, 체중:  $4.0 \pm 0.7$  g)으로부터 각각 20마리씩을 잡아내어 측정된 결과, 턱기형 그룹의 개체가 다른 그룹 개체를 보다 조금 작았지만 통계학적 유의차는 없었다( $p > 0.05$ ) (Fig. 2).

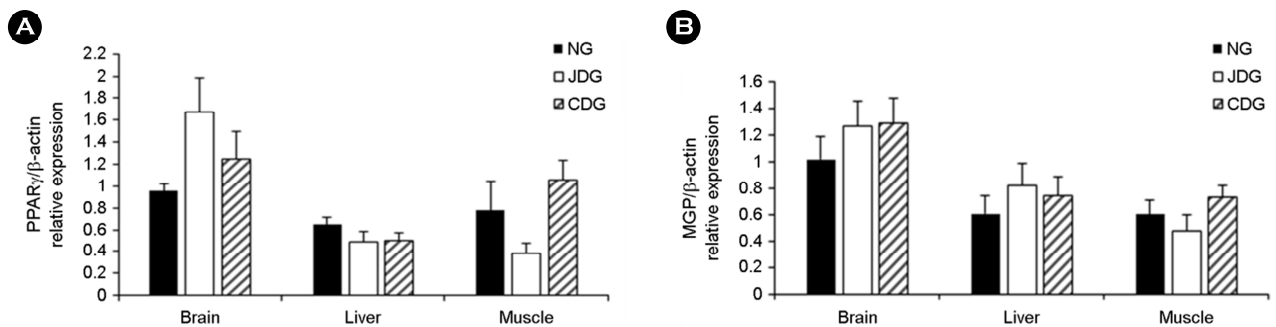
정상 및 턱기형, 머리기형 치어의 뇌, 간, 근육 조직을 각각 잘라내어 total RNA를 추출한 후 조직별 IGF-1, BMP4, PPAR $\gamma$ , MGP

유전자 발현을 조사하여 비교하였다. 그 결과, 뇌에서는 정상 그룹에서 IGF-1 유전자가 기형 그룹에서 보다 많이 발현되었고( $p < 0.05$ ) 턱기형과 머리기형의 IGF-1 유전자 발현량은 서로 차이가 없었다(Fig. 3). 반대로 간에서는 정상 그룹의 IGF-1 유전자 발현량이 가장 적었고 머리기형 그룹이 가장 많은 IGF-1 유전자 발현량

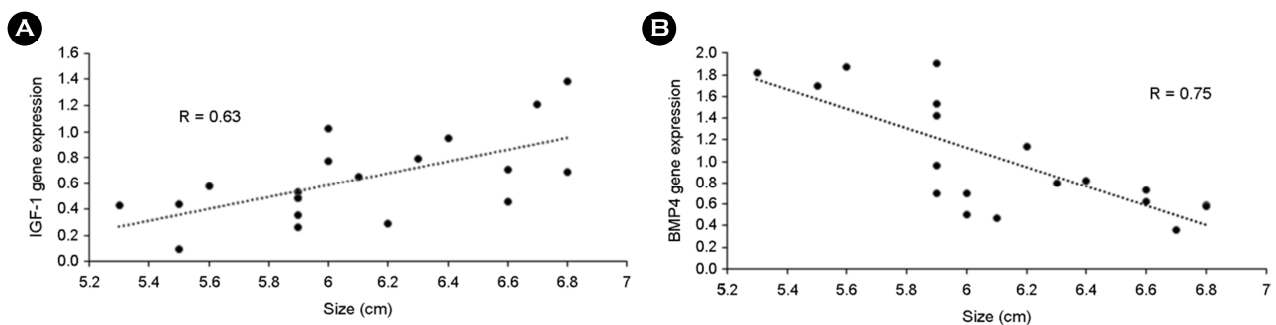
을 나타냈다( $p < 0.05$ ). 근육에서의 IGF-1 유전자 발현량은 정상 그룹과 기형 그룹 사이에 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ). BMP4 유전자는 뇌에서는 정상 그룹에서 기형 그룹보다 유의하게 많이 발현하였다. 반면, 간에서는 턱기형 그룹이 머리기형과 정상 그룹보다 더 많은 BMP4 유전자 발현을 보였다( $p < 0.05$ ). 근육에서의



**Fig. 3.** Expression of IGF-1 mRNA (A) and BMP4 mRNA (B) in the brain, liver and muscle of juvenile red spotted grouper with or without deformity (normal group: NG, jaw deformity group: JDG, cephalic deformity group: CDG) by real-time quantitative RT-PCR assay (n=20). Different letters above the bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Expression of PPARγ mRNA (A) and MGP mRNA (B) in the brain, liver and muscle of juvenile red spotted grouper with or without deformity (normal group: NG, jaw deformity group: JDG, cephalic deformity group: CDG) by real-time quantitative RT-PCR assay (n=20). No significant differences were observed ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 5.** Regression analysis of relationship between fish size (cm) and IGF-1 (A) or BMP4 (B) gene expression in the liver of juvenile red spotted grouper without deformity ( $p < 0.05$ ).

BMP4 유전자 발현량은 정상 그룹과 기형 그룹 사이에 차이를 보이지 않았다( $p>0.05$ ). PPAR $\gamma$ 와 MGP 유전자 발현량은 뇌, 간, 근육 조직 모두에서 정상 그룹, 턱기형 그룹 그리고 머리기형 그룹 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다( $p>0.05$ ) (Fig. 4).

한편, 회귀분석 결과 붐바리 간조직에서 IGF-1과 BMP4 유전자 발현량은 치어의 크기와 상관성이 있는 것으로 나타났는데, IGF-1 유전자 발현은 치어의 크기가 커질수록 증가하였고 반대로 BMP4 유전자 발현은 치어의 크기가 커질수록 감소하였다(Fig. 5). 하지만 뇌에서 이 유전자들의 발현량은 개체의 크기와 무관하였다.

## 고 찰

본 연구에서 조사한 4개의 형태형성 관련 유전자(IGF-1; BMP4; PPAR $\gamma$ ; MGP 유전자) 가운데 IGF-1과 BMP4 유전자는 치어 단계의 붐바리 기형 상태와 관련되어 있는 것으로 보인다. 부화 후 96일 붐바리 치어에서 IGF-1과 BMP4 유전자는 기형 그룹의 뇌와 간에서 정상 그룹과 비교하여 유의한 발현 차이를 나타냈다. 반면에 PPAR $\gamma$ 와 MGP 유전자는 어떤 조직에서도 정상 그룹과 기형 그룹 사이에 유의한 발현 차이를 보이지 않았다.

IGF-1의 합성 및 방출은 뇌하수체로부터 생성된 성장호르몬(Growth hormone, GH)의 수용체 결합을 통해 주로 간에서 촉진되며, IGF-1의 발현은 세포에서 단백질, 지질, 탄수화물 및 미네랄 대사 조절을 통해 성장에 중요한 역할을 한다(Moriyama et al., 2000). 뿐만 아니라, IGF-1은 조골세포(osteoblast)의 증식을 유도하여 척추동물의 골격 형성에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며, IGF-1 유전자 발현에 이상이 생기면 기형화 한다(Darias et al., 2011a, b). European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)의 예를 보면, 비타민A의 공급량에 따라 IGF-1 유전자 발현에 차이를 보였으며 결핍이나 과잉 모두에서 기형화가 일어났다(Darias et al., 2011b). 본 연구에서 붐바리 치어는 모두 동일한 사료를 공급 받았으며, 조사 시점에 정상과 기형 그룹 사이에 유의한 크기 차이도 없었기 때문에 뇌와 간에서의 IGF-1 발현량 차이가 영양 상태와 관련된 것으로 볼 수 없다. 본 연구 붐바리 정상 그룹에서 간 IGF-1 유전자 발현은 개체의 크기가 클수록 증가하는 경향을 보였기 때문에, 크기가 크지도 않은 기형어의 간에서 관찰된 많은 IGF-1 유전자 발현은 성장보다는 기형 상태와 연관되어 있을 가능성이 크다. 하지만 기형 개체가 간에서 높은 IGF-1 유전자 발현을 보였고 반대로 정상 개체가 뇌에서 높은 IGF-1 유전자 발현을 보인 이유는 아직 관련된 정보가 부족하여 명확하게 설명하기 어렵다.

BMP4는 형태형성 및 골격 발달에 중요한 역할을 하지만, 과발현 시 어류의 아래턱 골격 이상을 유발할 수 있다(Albertson et al., 2005). 고도 불포화 지방산(highly unsaturated fatty acid, HUFA)은 기형 유발요인의 하나이며, 어류 유생 발달에 중요한 역할을 한다. 그런데, 불균등한 HUFA 섭취는 RXR $\alpha$ , BMP4 등의 유전자 발현의 하향 조절을 유도하고 그 결과 기형으로 발생될 수 있다(Boglione

et al., 2013). 또한 HUFA를 과도하게 섭취하면 BMP4와 RXR $\alpha$ 가 상향 조절되며, 이 과정을 통해 조골세포 분화 과정이 가속화되고 결과적으로 골격 과다 발달로 인한 기형화가 일어날 수 있다(Villeneuve et al., 2006). 본 연구에서 BMP4 유전자의 발현을 보면 뇌 조직에서는 정상 그룹이 가장 많은 발현량을 나타냈지만, 간 조직에서는 턱기형 그룹이 가장 많은 BMP4 유전자 발현을 보였다. 타 연구자들의 선행 연구 결과들은 BMP4 유전자 과발현이 턱 기형 발생과 연관되어 있음을 보여준다. 병어 *Trachinotus ovatus* 자어(Ma et al., 2018), 시클리드과 어류 자어 2종 *Labeotropheus fuelleborni*, *Metriacilia zebra* (Albertson et al., 2005), 제브라피쉬(Villeneuve et al., 2006) 모두에서 BMP4 유전자 발현은 턱의 형태와 관련되어 있었다. 결정적 발현 부위와 발현 시기는 보다 자세하게 연구되어야 할 숙제로 남아있지만, BMP4와 턱 형태와의 연관성은 확실한 것으로 판단된다. Villeneuve et al. (2006)는 골격 형성이 완료되면 BMP4 발현이 줄어든다고 하였는데, 본 연구에서 턱기형의 BMP4 유전자 발현이 치어 단계에서도 높았던 것은 기형 상태 유지 때문일 수도 있다. 실제로 정상 개체에서 크기와 BMP4 발현을 보면, 크기가 증가할수록 BMP4 발현이 감소하는 것을 볼 수 있다. 그럼에도 불구하고 크기와 무관하게 높게 발현된 붐바리 기형 개체의 BMP4 유전자는 기형 상태와 연관되어 있을 가능성이 높다.

PPAR $\gamma$ 는 HUFA의 핵 수용체로서 대사에 관여하며 PPAR-RXR과 heterodimers를 형성하여 지질 대사 및 형태형성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하며(Tontonoz et al., 1994), 과도한 PPAR $\gamma$ 는 기형 발생을 초래할 수 있다. 하지만 본 연구에서 붐바리 치어의 PPAR $\gamma$  유전자 발현 결과를 보면 정상 그룹과 기형 그룹에서 유의한 차이가 없었다. MGP는 혈관과 연골의 석회화(calcification) 억제에 관여한다고 알려져 있는 단백질이다(Luo et al., 1997; Lall et al., 2007). 하지만 MGP도 PPAR $\gamma$ 와 마찬가지로 모든 붐바리 치어 조직에서 정상 그룹과 기형 그룹의 유의한 발현 차이가 없었다.

본 연구에서 진행한 96일차 붐바리 치어의 정상 그룹과 기형 그룹에서 IGF-1과 BMP4는 명확한 발현 차이를 보였다. 이것은 치어 단계에서도 기형화가 계속 진행되고 있다는 것을 의미할 수도 있고, 아니면 발생 초기에 일어난 기형화의 결과로 기형의 유지를 위해 이 유전자들이 계속 차별적으로 발현되는 것일 수도 있다. 어떤 경우이든 이 두 유전자가 붐바리 치어의 기형 상태와 연관되어 있다는 것은 확실하다. PPAR $\gamma$ 와 MGP 유전자는 발생 초기에 영향을 미칠 수는 있지만 치어 단계에서는 붐바리 기형 상태와 연관되어 있지 않다. 앞으로의 연구에서 보다 다양한 유전자를 대상으로 정상과 기형 상태의 발현 차이를 조사해 본다면 기형의 원인 파악 및 대책 마련에 유익한 정보로 활용될 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 213008-



05-3-WT511, 사육환경 요소에 따른 치어의 적응 생리 특성 조사)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Abzhanov A, Protas M, Grant BR, Grant PR, Tabin CJ. 2004. Bmp4 and morphological variation of beaks in Darwin's finches. *Science* 305: 1462-1465.
- Albertson RC, Streelman JT, Kocher TD, Yelick PC. 2005. Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *PNAS* 102: 16287-16292.
- Bogliione C, Gavaia P, Koumoundouros G, Gisbert E, Moren M, Fontagne S, Witten PE. 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Reviews in Aquaculture* 5: S99-S120.
- Cornish A. 2018. *Epinephelus akaara*. The IUCN Red List of Threatened Species. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2003.RLTS.T43974A10846282.en>
- Darias MJ. 2011a. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture* 315: 49-60.
- Darias MJ. 2011b. Imbalanced dietary ascorbic acid alters molecular pathways involved in skeletogenesis of developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol, Part A* 159: 46-55.
- Hogan BLM. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10: 1580-1594.
- Kim JE, Kim HB, Lee YD, Baek HJ. 2017. Correlation of developmental deformity with calcium, phosphorus, or estradiol-17 $\beta$  levels in reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara* juveniles. *Dev Reprod* 21: 391-397.
- Koumoundouros G. 2010. Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. In: Koumoundouros G (ed.), *Recent Advances in Aquaculture Research*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp 125-148.
- Lall SP, Lewis-McCrea LM. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. *Aquaculture* 267: 3-19.
- Lee BI, Kim SK, Kwon ON, Park HG, Park JC. 2013. The optimal salinity and temperature condition for the growth of rotifer, *Keratella sp.* *KSFME* 25: 1205-1213.
- Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. *Nature* 385: 78-81.
- Ma Z, Hu J, Yu G, Qin JG. 2018. Gene expression of bone morphogenetic proteins and jaw malformation in golden pompano *Trachinotus ovatus* larvae in different feeding regimes. *J Appl Anim Res* 46: 164-177.
- Moriyama S, Ayson FG, Kawauchi H. 2000. Growth regulation by insulin-like Growth factor-1 in fish. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1553-1562.
- Park JY, Han KH, Cho JK, Myeong, JI, Park JM. 2016. Early osteological development of larvae and juveniles in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Dev Reprod* 20: 87-101.
- Shin CS, Cho HY. 2005. Bone remodeling and Mineralization. *Endocrinology and Metabolism* 20: 543-555.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. 1994. mPPAR $\gamma$ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8: 1224-1234.
- Viegas CSB, Simes DC, Williamson MK, Cavaco S, Laize V, Price PA, Cancela ML. 2013. Sturgeon osteocalcin shares structural features with matrix Gla protein: evolutionary relationship and functional implications. *J Biol Chem* 288: 27801-27811.
- Villeneuve LAN, Gisbert E, Moriceau J, Cahu CL, Zambonino Infante JL. 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Br J Nutr* 95: 677-687.
- Wan Y. 2010. PPAR $\gamma$  in bone homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 21: 722-728.
- Yildirim S, Coban D, Suzer C, Firat K, Saka S. 2014. Skeletal deformities of cultured sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) larvae during early life development. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 61: 267-273.
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL. 2010. Effect of nutrition on marine fish development and quality. In: Koumoundouros G (ed.), *Recent Advances in Aquaculture Research*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp 103-124.