

REVISIÓN: DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE LA MUSCULATURA AXIAL DE LA LUBINA *Dicentrarchus labrax* L.

Review: development and growth of the axial musculature of the sea bass *Dicentrarchus labrax*, L.

López-Albors O.¹, Ayala M^a D.¹, García Alcázar A.², Abdel I.², Abellán E.², Ramírez Zarzosa G.¹, Gil, F.¹

¹ Anatomía Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España.

² Centro Oceanográfico de Murcia, Insitituto Español de Oceanografía.

Autor de referencia: albors@um.es

RESUMEN

Se compendian en este trabajo los estudios realizados sobre el desarrollo y crecimiento de la musculatura axial de la lubina *Dicentrarchus labrax* L., incluyéndose también algunos resultados y conclusiones relevantes en otras especies. En el momento de la eclosión, la larva de lubina presenta dos estratos musculares: músculo rojo superficial y músculo blanco, ambos con un apreciable grado de inmadurez histológica. Desde la eclosión hasta el momento de la apertura de la boca las fibras musculares rojas y blancas crecen únicamente por hipertrofia. Sin embargo, con el inicio de la alimentación externa, la larva de lubina inicia un periodo de intenso crecimiento muscular hipertrófico e hiperplásico. Hasta el final de la fase larvaria, además de importantes cambios estructurales y en las isoformas de miosina de las fibras rojas y blancas, se diferencia progresivamente el músculo intermedio o rosa. Durante la fase postlarvaria, los procesos de maduración histológica de la musculatura persisten hasta el comienzo de la edad juvenil (\approx 6 meses). En alevines y juveniles de lubina, la dinámica del crecimiento muscular está influenciada por la época del año, en función de factores medioambientales como la temperatura y el fotoperiodo. Esta influencia afecta de forma muy acentuada a la hiperplasia muscular, la cual describe una secuencia alternante con valores máximos durante el verano e inicio del otoño.

Palabras clave: lubina, músculo, desarrollo, crecimiento, hiperplasia.

ABSTRACT

This work summarizes the previous information on the development and growth of the axial musculature of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Relevant results and conclusions from other teleost species in these subjects are also included. At hatching, the axial musculature of sea bass larvae has two strata: the superficial red and the deep white muscles, both with an evident histological immaturity. Hypertrophy of red and white muscle fibres is the unique mechanism of muscle growth since hatching to mouth opening. After mouth opening, larvae

enter a period of intense muscle growth by both hypertrophy and hyperplasia of muscle fibres. Throughout the larval phase, red and white muscle fibres undergo structural changes and a progressive replacement of different myosin isoforms. The intermediate pink muscle is evident towards the end of the larval life. Histological maturation of muscle fibres persist during the postlarval life until the beginning of the juvenile period (\approx 6 month). In fingerlings and juveniles, muscle growth dynamics is seasonally influenced by environmental factors such as temperature and photoperiod. Muscle fibre recruitment is particularly affected so that it is maximum in summer and minimum in winter.

Key words: sea bass, muscle, development, growth, hyperplasia.

INTRODUCCIÓN

La lubina, junto con la dorada *Sparus aurata*, L., son las principales especies responsables del auge de la acuicultura mediterránea durante los últimos 10 años. En España, el cultivo de la lubina ha experimentado un considerable incremento en los últimos años, llegándose a producir en 2004 un total de 4.513,3 toneladas (Jacumar, www.mapya.es/jacumar/). El crecimiento de la producción ha tenido lugar gracias a un control exhaustivo de los factores biológicos (control de la reproducción, alimentación, patologías, etc.) y económicos (costes de producción, de mercado, etc.) que lo condicionan. Pickett y Pawson (1994) han publicado una monografía donde se encuentra amplia información sobre las características biológicas, ecológicas y de producción intensiva de la lubina.

El desarrollo de la musculatura axial de los teleósteos comprende procesos de diferenciación y crecimiento. Estos procesos se inician durante la gastrulación embrionaria y prosiguen durante las fases larvaria y postlarvaria. En un primer momento, durante las fases embrionaria y larvaria temprana, los procesos de diferenciación muscular predominan sobre el crecimiento (Kamler, 1992). En estas fases, el desarrollo embrionario de la musculatura axial culmina con la formación de dos estratos musculares en los miotomos de las larvas: un estrato superficial de fibras musculares que, formando una monocapa, se sitúa en la periferia del miotomo; y un estrato profundo integrado por varias capas de fibras musculares. Dichos estratos musculares son los precursores de los futuros músculos

rojo y blanco, respectivamente, principales integrantes de la musculatura del pez adulto.

Durante la metamorfosis larvaria, el intenso crecimiento corporal asociado al comienzo de la alimentación externa y a su capacidad de natación libre, determina que los procesos de crecimiento muscular tengan mayor relevancia. Así, las fibras musculares de los dos estratos musculares iniciales —superficial y profundo— deberán incrementar su tamaño (hipertrofia) mediante una importante actividad de síntesis proteica. No obstante, en muchos teleósteos, hay que resaltar que el desarrollo de la musculatura axial va a mantenerse durante gran parte de su ciclo vital merced a su **capacidad para aumentar el número de las fibras musculares del miotomo (hiperplasia)**. Esta particularidad establece un hecho diferencial importante con lo que ocurre durante el desarrollo de la musculatura en los mamíferos y aves. En estos últimos, el desarrollo de la musculatura esquelética, organizada en músculos individuales, acontece mediante una combinación de procesos de diferenciación (miogénesis) y crecimiento. Sin embargo, el nacimiento o eclosión, según el caso, determina un drástico cambio en el desarrollo de la musculatura (Goldspink, 1972; Champion, 1984), de forma que, en condiciones fisiológicas, ya no se describen más procesos miogénicos, lo que, a su vez, impide la existencia de un crecimiento hiperplásico postnatal. En los peces teleósteos, la existencia de un crecimiento muscular hiperplásico prolongado durante gran parte de la vida del pez se fundamenta en una persistencia de la actividad miogénica, tanto en el músculo rojo (superficial) como en el músculo blanco

(profundo). Esto es especialmente significativo en los teleósteos de rápido crecimiento y gran tamaño final (Stickland, 1983; Romanello *et al.*, 1987; Higgins y Thorpe, 1990). Tal es el caso de la lubina, y el de la mayoría de las especies de interés piscícola: salmón, trucha, dorada, anguila, dentón etc.

En esta revisión recopilamos los conocimientos existentes hasta el momento sobre el desarrollo y crecimiento de la musculatura axial de la lubina. No obstante, también se incluyen de forma resumida los resultados y conclusiones más destacadas encontradas en otras especies en las que las investigaciones están considerablemente más avanzadas.

1. DESARROLLO MUSCULAR DURANTE LA FASE EMBRIONARIA

Hasta el momento, apenas existen estudios específicos que aborden la miogénesis de la lubina desde los estadios embrionarios (Wilkes *et al.*, 2001), ya que la mayoría de los trabajos realizados se inician en el momento de la eclosión (1 día) (Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998). La rapidez del desarrollo embrionario de esta especie (3-4 días a aproximadamente 15°C) y la dificultad técnica del trabajo con embriones podrían explicar este hecho. Otras especies en las que sí se ha estudiado con detalle la miogénesis son el arenque *Clupea harengus* L. (Johnston *et al.*, 1995, 1997), el salmón atlántico *Salmo salar*, L. (Johnston *et al.*, 1999), la trucha común *Salmo trutta trutta*, L. (Killeen *et al.*, 1999), la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum (Nag y Nursall 1972, Wilkes *et al.*, 2001), el rutilo del Mar Negro *Rutilus frisii meidingeri*, Nordman (Stoiber *et al.*, 1998) y, de manera muy destacada, el pez cebra *Danio rerio*, Hamilton (Waterman 1969; Van Raamsdonk *et al.*, 1974, 1978; Felsenfeld *et al.*, 1991; Devoto *et al.*, 1996; Watabe, 1999; Te Kronnie, 2000).

Los primeros indicios de la miogénesis de la musculatura axial se observan durante la gastrulación embrionaria. En el pez cebra, los primeros estudios realizados en este campo (Waterman, 1969; Van Raamsdonk *et al.*, 1974), determinaron que a las 24 horas de la fertilización ya se observaban miofilamentos en el interior de células mononucleadas alargadas próximas a la notocorda (células mesenquimatosas del mesodermo paraaxial). A las 40-45 horas post-fertilización, tras un proceso de diferenciación de esos primeros mioblastos en sentido mediolateral, el miotomo queda integrado por tres estratos celulares: una capa de células externas situadas en la superficie, una monocapa subyacente de células superficiales (músculo rojo primitivo) y un conjunto de varias capas de células profundas (músculo blanco primitivo). Sobre la base de estos primeros estudios, otros trabajos mucho más recientes han clarificado bastante los principales acontecimientos durante la miogénesis embrionaria del pez cebra.

Desde un punto de vista morfológico, la miogénesis está asociada a la segmentación de los somitos del embrión. La somitogénesis del pez cebra se inicia poco después de la culminación de la epibolia. En ese momento, a ambos lados de la notocorda se observan dos agrupaciones celulares: una en profundidad, integrada por **células mediales o adaxiales**, y otra más superficial de **células presomíticas laterales** (Devoto *et al.*, 1996). Mientras que las células adaxiales son grandes y cuboideas, las laterales son más pequeñas e irregulares. Según se ha podido concluir en diferentes trabajos realizados, parece ser que las células adaxiales están determinadas a formar músculo de contracción lenta por influencia de diferentes glucoproteínas de la familia Hedgehog (Sonic, Echidna, Tigglywinkle). Para ello, migran a través del somito hasta alcanzar su superficie. Una vez allí, se convertirán en fibras embrionarias superficiales (Devoto *et al.*, 1996; Blagden *et al.*, 1997), precursoras del músculo rojo. Simultáneamente, las células presomíticas laterales, que perma-

necen aproximadamente en la misma posición, comienzan a diferenciarse en fibras precursoras del músculo blanco. A todo lo dicho, hay que añadir la existencia de una subpoblación de las células adaxiales que no migra completamente a la superficie lateral del miotomo, sino que se extiende desde la notocorda a la superficie lateral del somita a nivel del futuro septo horizontal. El comportamiento y posición de este subgrupo de células es semejante al descrito para los “**músculos pioneros**” o **primordiales** (Hatta *et al.*, 1991), los cuales desempeñan un papel morfogénico fundamental en la conformación de los miotomos y particularmente del septo horizontal (Hatta *et al.*, 1991; Ekker *et al.*, 1992). En concreto, la participación de estos “músculos” y del septo horizontal es imprescindible para el correcto plegamiento del miotomo desde su morfología inicial cuboidea a la típica forma en W. En embriones de arenque, Johnston *et al.* (1995, 1997) observaron también miotubos en una posición semejante y con una misma morfología que los músculos primordiales descritos en el pez cebra.

La morfogénesis de los dos estratos fundamentales de la musculatura axial de las larvas precisa de complejos mecanismos de diferenciación y de regulación celular. La **diferenciación** celular implica cambios sustanciales en las células precursoras musculares que deben conducirles a la formación de miocitos (fibras musculares). Estos cambios deben seguir una secuencia ordenada, que permita una progresión desde una forma celular apenas diferenciada o pluripotencial (célula madre miogénica), a formas más evolucionadas, precursoras directas de los mioblastos. A partir de ahí, la maduración y fusión de diferentes mioblastos dará lugar a miotubos, que finalmente se diferenciarán en los definitivos miocitos.

La diferenciación celular durante la miogénesis de la musculatura axial implica la existencia de complejos procesos de expresión génica y síntesis proteica, así como una activa multiplicación y fusión celular. La expresión

génica de los factores de regulación miogénica (MRFs) es el paso fundamental que determina el comienzo de la miogénesis en los embriones de los teleósteos. Tales factores de regulación no sólo inician la miogénesis, sino que también se encargan de regular los procesos de diferenciación celular anteriormente citados. Factores de regulación como el MyoD y myf-5 son necesarios para que las células madre miogénicas queden marcadas o determinadas a diferenciarse en precursores de fibras musculares (inducción de un linaje muscular). Por otro lado, otros factores de regulación como Miogenina, MEF2 y MRF4 son responsables del comienzo de la diferenciación y de su mantenimiento. Uno de los modos de acción de los factores de regulación miogénica (MRFs) consiste en unirse a las zonas promotoras de los genes que determinan la síntesis de proteínas musculares específicas como la tropomiosina, actina, etc. (Watabe 1999, 2001). Aunque el conocimiento sobre los tipos de MRFs y sus posibles funciones no deja de incrementarse en los últimos años, Te Kronie (2000) y Watabe (2001) han realizado importantes actualizaciones del tema.

Según un modelo explicativo sencillo propuesto por Johnston (1999), a partir de las células madre miogénicas se forman las llamadas *células precursoras musculares* (mioblastos presuntivos). Estas células, ya inducidas a formar un linaje muscular, experimentan divisiones asimétricas que permiten, por un lado, regenerar las células precursoras originales y, por otro, dar lugar a formas celulares más evolucionadas denominadas *células productoras*. Estas últimas, experimentan un número limitado de divisiones antes de convertirse en mioblastos. Los mioblastos, finalmente, bien se fusionan entre sí formando miotubos multinucleados, que darán lugar a las nuevas fibras musculares, o bien se fusionan a fibras musculares previamente existentes. Según este mismo autor, es importante investigar en qué medida factores externos como la alimentación o las condicio-

nes medioambientales pueden actuar modificando la duración del ciclo celular y/o el número de divisiones de las células productoras antes de su diferenciación terminal, o bien alterando el balance entre señales de proliferación y diferenciación. Esto podría tener importantes implicaciones en el posterior crecimiento corporal, ya que, al menos a corto plazo, el potencial de crecimiento está en gran parte determinado por el número de fibras que se generan en la musculatura axial (Johnston *et al.*, 1998, 2000; Ayala *et al.*, 2001; Wilkes *et al.*, 2001).

2. DESARROLLO Y CRECIMIENTO MUSCULAR DURANTE EL PERÍODO LARVARIO

El momento de la eclosión es una referencia fácil de establecer para caracterizar el desarrollo larvario de la musculatura axial. Aunque existen grandes diferencias entre las especies, durante los primeros días tras la eclosión, el principal acontecimiento que se describe en la musculatura axial es que se consolida la morfogénesis de los dos estratos musculares fundamentales de los teleósteos: el músculo superficial (rojo) de contracción lenta, y el músculo profundo (blanco) de contracción rápida. Una vez diferenciados, ambos estratos musculares crecen de forma muy significativa, mediante un aumento del tamaño de los miocitos que los integran (hipertrofia), y por incorporación de nuevas fibras musculares (hiperplasia), formándose las nuevas fibras a partir de células miogénicas embrionarias indiferenciadas. Este proceso de hiperplasia larvaria, 2ª *miogénesis*, fase de *crecimiento aposicional* o fase de *crecimiento estratificado* (Rowlerson y Veggetti, 2001) ha sido descrita en numerosos trabajos (Weatherley *et al.*, 1979; Talesara y Urfi, 1987; Johnston *et al.*, 1995; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; Rowlerson *et al.*, 1995; Arizcun *et al.*, 2005). Esta fase de crecimiento se fundamenta en la existencia de células precursoras miogénicas localizadas en la periferia —extremos epi e hipoaxial del

miotomo— y a nivel del septo transversal (entre los músculos rojo y blanco).

El desarrollo y crecimiento de la musculatura axial de la **lubina** desde la eclosión ha sido descrito mediante técnicas histoquímicas (metabólicas, mATPasa e inmunohistoquímicas) y morfométricas, así como mediante microscopía electrónica de transmisión por diferentes autores (Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990; López-Albors, 1994; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998, 2003; Ayala *et al.*, 2000, 2001).

A la *eclosión*, una sección transversal completa a nivel de la apertura anal muestra que la larva de lubina presenta dos estratos de fibras musculares, ambos con un apreciable grado de inmadurez: una monocapa de fibras rojas superficiales y un estrato más grueso de fibras blancas profundas (Fig. 1). Las **fibras rojas superficiales**, se sitúan inmediatamente debajo de la piel, todo a lo largo de la superficie externa del miómero. Estas fibras presentan una morfología casi rectangular a la sección transversal. En ellas abundan las mitocondrias, situadas tanto en la periferia como en el centro de las fibras. Las miofibrillas se agrupan formando bucles o anillos, y los núcleos, eucromáticos y con evidentes nucleolos, se sitúan preferentemente hacia el polo externo de la fibra. Inicialmente, las fibras rojas superficiales están más diferenciadas a nivel del septo horizontal que hacia los extremos epi e hipoaxial del miotomo. Desde un punto de vista histoquímico son fibras con un elevado metabolismo oxidativo y elevada actividad mATPasa alcalino y acidorresistente (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998). La miosina es de tipo “roja larvaria1” (Scapolo *et al.*, 1988), reaccionando de forma positiva, tanto ante sueros anti miosina lenta (anti-S) como rápida (anti-F). Las **fibras del músculo blanco** presentan una morfología poligonal, abundantes miofibrillas y escasas mitocondrias. Según el grado de diferenciación, las fibras blancas pueden presentar todavía los núcleos en el centro o ya en la periferia de la

fibra. La actividad metabólica de estas fibras es fundamentalmente glicolítica. Por su parte, la actividad mATPasa se inactiva parcialmente tras la realización de preincubaciones alcalinas y, totalmente tras preincubaciones ácidas (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995). La miosina de estas fibras es de tipo "blanco larvario 1" (Scapolo *et al.*, 1988), con una reacción ligeramente positiva frente a sueros anti-S y anti-F.

Además de fibras musculares, el miotomo de la larva de lubina recién eclosionada presenta una capa superficial de **células externas** (Fig. 1). Son células aplanadas, que mantienen contactos entre sus membranas y que presentan una ultraestructura escasamente diferenciada. Las células externas no presentan nunca miofilamentos y su significado funcional ha sido interpretado de forma dispar. Veggetti *et al.* (1990) y Ramírez-Zarzosa (1995) consideran factible el hecho de que estas células puedan diferenciarse en fibras musculares, de ahí que las cataloguen como mioblastos presuntivos. Por el contrario, en nuestra opinión (López-Albors *et al.*, 1998) dado que no presentan rasgos ultraestructurales típicos de mioblastos ni de células proliferativas, su significado más bien parece asociado al del dermomioto. Esta sugerencia ya fue apuntada por Waterman (1969) en el pez cebra y coincide con la interpretación de Johnston (1993) en el arenque.

El número de fibras rojas superficiales en los miotomos situados a nivel de la apertura anal de la larva recién eclosionada es de aproximadamente 100, y el de fibras blancas aproximadamente de 225 (Ayala *et al.*, 2000, 2001). Desde la eclosión hasta el momento de la apertura de la boca transcurren entre 3 y 6 días, según la temperatura de cultivo (19 o 15 °C, respectivamente) (Ayala *et al.*, 2000, 2001). Durante este tiempo, destaca el hecho de que las fibras musculares blancas y rojas crecen por hipertrofia, pero no aumentan en número de forma significativa (Ayala *et al.*, 2000, 2001). Así, durante la fase vitelina, momento en el cual la disponibilidad de nutrientes está limitada, el

único mecanismo de crecimiento muscular que desarrolla la larva de lubina es la hipertrofia. Este hecho demuestra que la hipertrofia es un mecanismo de crecimiento más adecuado para este periodo del desarrollo larvario que la hiperplasia, hecho que también ha sido descrito en el salmón atlántico y en el arenque (Usher *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1998).

Con el *inicio de la alimentación externa* tras la reabsorción del saco vitelino, la larva de lubina inicia un periodo de intenso crecimiento muscular. Los estratos musculares rojo y blanco se engruesan considerablemente tanto por hipertrofia de las fibras formadas durante el periodo embrionario, como por generación de nuevas fibras. Se corresponde este crecimiento hiperplásico con la 2ª miogénesis ya citada. En concreto, el número de fibras rojas a los 50 días es de aproximadamente 250 y el de blancas 3500 (Ayala *et al.*, 2000).

El músculo rojo incorpora mioblastos desde la vecindad del septo horizontal, y también en los extremos epi e hipoxial del miotomo. A los 16-25 días, a nivel del septo horizontal (línea lateral) el músculo rojo generalmente presenta una bicapa o incluso tricapa de fibras. Además, desde este momento resulta llamativa la presencia de una agrupación de fibras en la profundidad de músculo rojo (Fig. 2a). Los rasgos estructurales de estas fibras difieren notablemente de los de las típicas fibras rojas superficiales. Se trata de fibras poligonales, con miofibrillas empaquetadas y agrupadas en el centro. Su actividad mATPasa es alcalina y acidolábil (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995), y su reacción inmunohistoquímica sólo positiva ante sueros antimiosina lenta (anti-S y anti-SHC) (Scapolo *et al.*, 1988). En nuestra opinión (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998) este nuevo tipo fibrilar, presenta un perfil histoquímico semejante al de las fibras rojas del músculo adulto, y terminarán diferenciándose en fibras rojas adultas. No obstante, Scapolo *et al.*, (1988), continúan considerándolas como un tipo "rojo larvario 2", dado que todavía encuen-

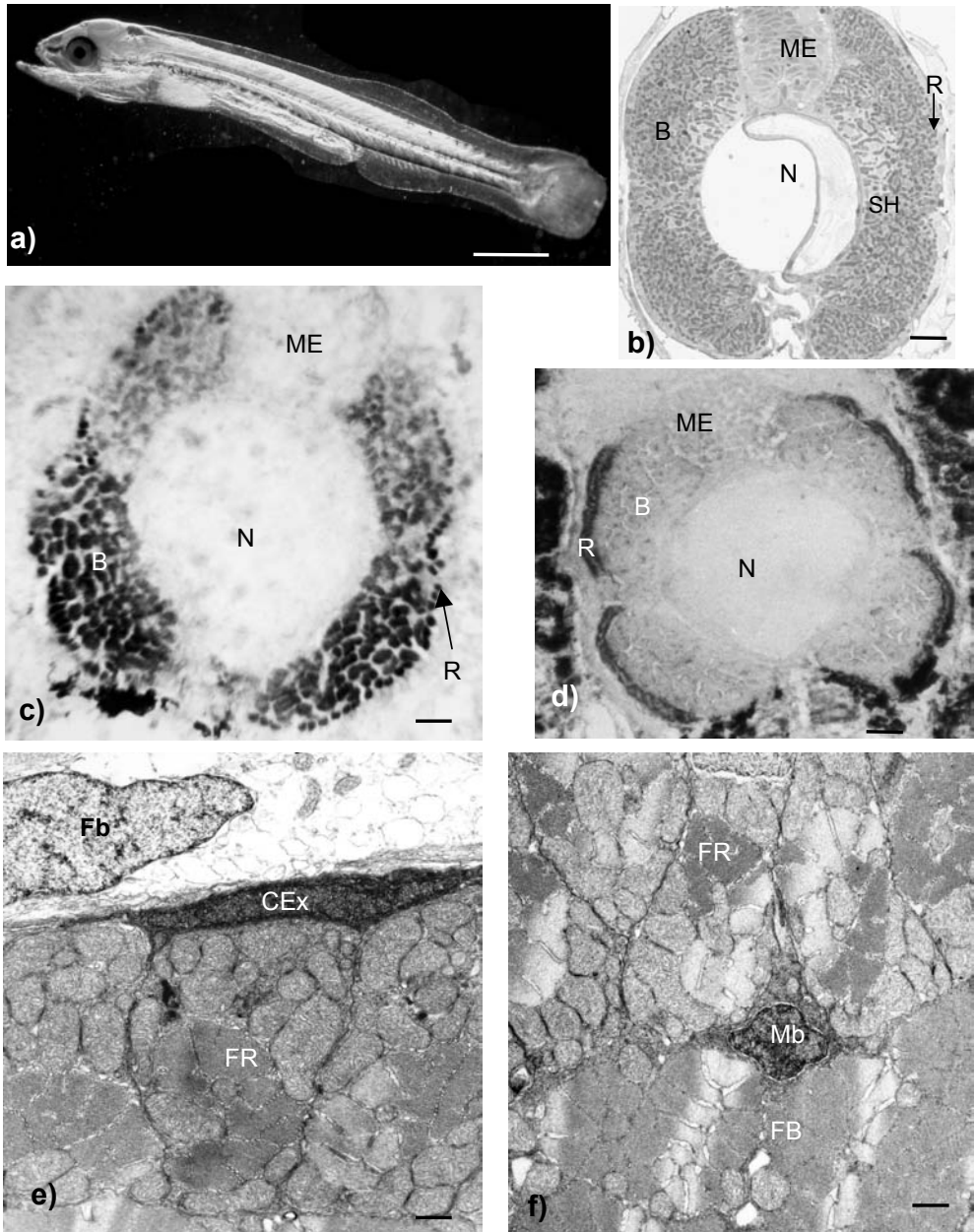


Figura 1. a) Larva de lubina de 33d.. Barra = 1mm. b) Sección transversal de una larva de lubina de 1d. a nivel de la apertura anal. Barra= 20 μ m. c) y d) Larva de 7d. c) mATPasa preincubación pH 9.45, 7min. Barra = 15 μ m. d) Técnica oxidativa NADH. Barra = 20 μ m. e) y f) Electronografías de la musculatura de una larva de 9d. Barra= 1.75 μ m. B: músculo blanco, R: músculo rojo, SH: septo horizontal, ME: médula espinal, N: notocorda, FR: fibra roja, FB: fibra blanca, Mb: mioblasto presuntivo, Cex: célula externa, Fb: fibroblasto.

tran alguna diferencia tintorial entre la actividad mATPásica de estas fibras y las de tipo rojo adulto. A partir de la tercera semana de vida larvaria este nuevo tipo fibrilar va a aumentar mucho en número, de tal manera que la mayoría de las nuevas fibras rojas que se forman van a ser de este tipo, acumulándose mayoritariamente a nivel del septo horizontal. Las fibras rojas adultas coinciden histoquímica e inmunohistoquímicamente con ellas.

Desde la 2ª semana de vida aproximadamente, entre el músculo rojo superficial y el músculo blanco se va configurando un fino septo conectivo que separa ambos estratos musculares. Es el denominado septo transverso, junto al cual proliferan abundantes mioblastos, que se incorporan mayoritariamente hacia el músculo blanco (Veggetti *et al.*, 1990) (Fig. 1f). Además, en los extremos epi e hipoaxial del miotomo se describe una abundante proliferación mioblástica asociada a la presencia en la periferia de un tejido conjuntivo mesenquimatoso, que también incorpora nuevas fibras musculares, preferentemente al músculo blanco (Veggetti *et al.*, 1990; López-Albors *et al.*, 1998) (Fig. 2b). Estas dos zonas de generación de nuevas fibras blancas son la fuente hiperplásica por la cual se produce el crecimiento aposicional o estratificado del músculo blanco (Rowlerson y Veggetti 2001). Las nuevas fibras del músculo blanco, fibras "blancas larvarias 2" manifiestan una actividad positiva sólo ante sueros antimiosina rápida (anti-F) (Scapolo *et al.*, 1988). Este nuevo perfil inmunohistoquímico será también adquirido progresivamente por las fibras blancas existentes desde la fase embrionaria (fibras blancas larvarias 1).

Hacia el *final del periodo larvario*, a ambos lados del septo horizontal y entre los músculos rojo y blanco, se va constituyendo progresivamente el **músculo intermedio o rosa** (Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995) (Fig. 2c,d). Las fibras rosas presentan rasgos estructurales y ultraestructurales intermedios a los de las fibras

rojas y blancas. Su actividad mATPasa, según la metodología de Mascarello *et al.* (1986, método B) es alcalino y acidoestable, hecho por el cual son fácilmente identificables. Además, estas fibras presentan una isoforma de miosina con inmunorreactividad diferente a la de las fibras blancas y rojas, ya que de un lado reaccionan positivamente frente a sueros específicos antimiosina rápida de peces, pero también ante sueros antimiosina rápida de mamíferos (anti-IIA), y de otro, no se tiñen con sueros antimiosina lenta como anti-S y anti-SHC (Scapolo *et al.*, 1988). Inicialmente, el músculo rosa está circunscrito a la zona adyacente al septo horizontal y situado internamente al septo transverso. Desde el final del periodo larvario, y durante la fase postlarvaria, el músculo rosa aumentará su grosor y se extenderá hacia los extremos del miotomo. A la vez, sus límites con los músculos rojo y blanco se van difuminando cada vez más, dado que las fibras ahí situadas parecen sufrir una transición miosínica que las convierte en fibras rojas o blancas, según el caso (López-Albors *et al.*, 1998; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998). Así, en ejemplares de lubina de más de 150 días se describen dos zonas a ambos lados del estrato intermedio, que ponen de manifiesto una contribución del músculo rosa al crecimiento hiperplásico de los músculos blanco y rojo (Fig. 3a). Esta función también ha sido descrita en otras especies por Sängner *et al.* (1988).

Hacia el final de la fase larvaria, en la parte profunda del músculo rojo y junto al septo horizontal también se detecta una agrupación de fibras histoquímicamente distintas a las fibras rojas (López-Albors *et al.* 1998). Estas fibras, redondeadas y de pequeño tamaño, presentan gran cantidad de material contráctil y escasas mitocondrias. Por otro lado, mientras que su actividad mATPasa es elevada ante preincubaciones ácidas y alcalinas, su capacidad oxidativa es escasa. Estas fibras, catalogables como **fibras tónicas** (Fig. 2c,d), también han sido descritas en otras especies, recibiendo diferentes nombres

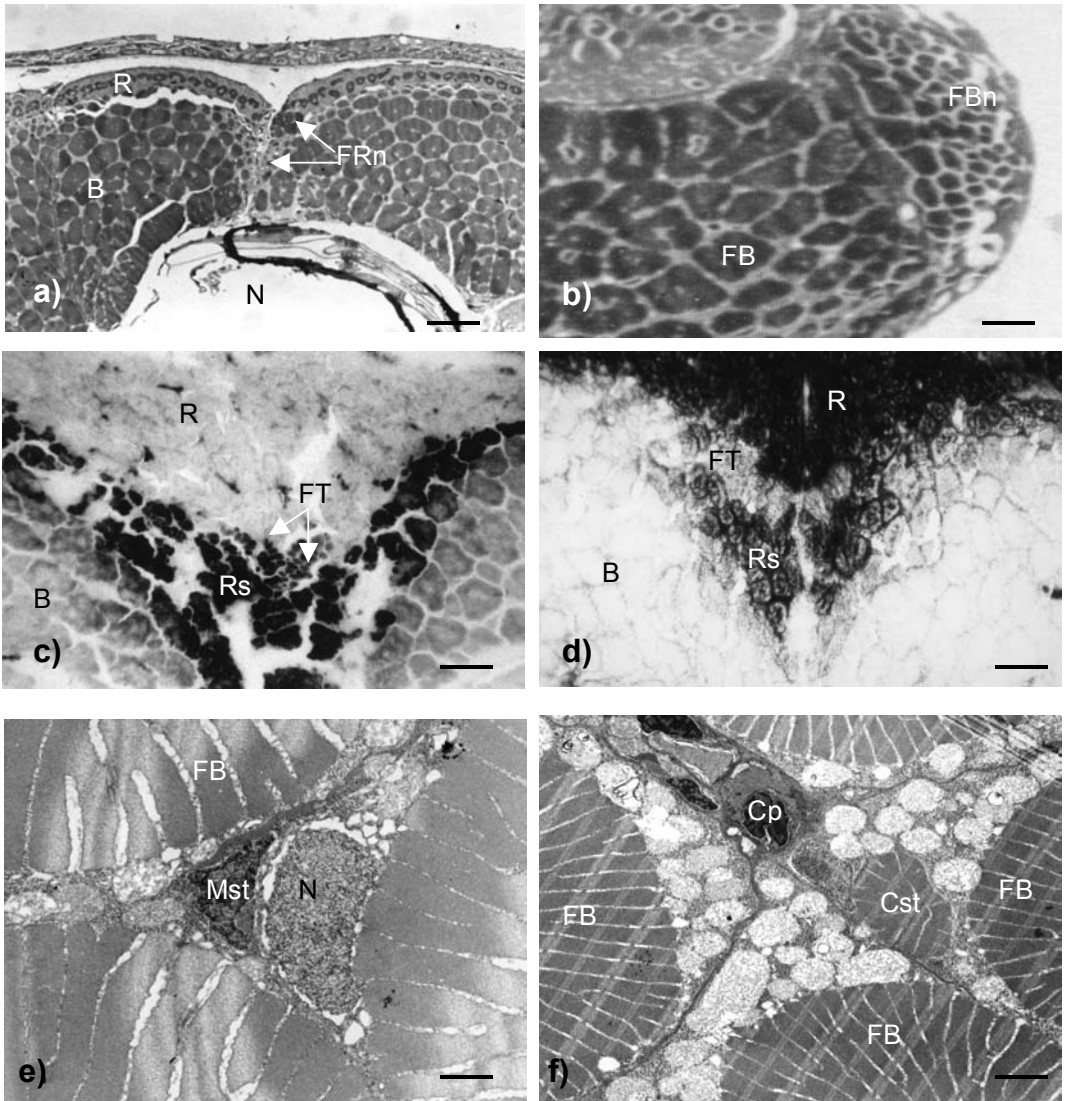


Figura 2. a) y b) Larva de 20d. Barras = 37 y 18.5 μ m. c) y d) Larva al final de la metamorfosis (70d). Barras = 55 μ m. c) mATPasa pH 4.6 (10seg). d) Reacción oxidativa NADH. e) y f) Electronografías del músculo blanco de larvas de 60d. Barras = 0,75 y 2.25 μ m. B: músculo blanco, R: músculo rojo, Rs: músculo rosa, N: notocorda, FRn: fibras rojas nuevas, FB: fibra blanca, FBn: fibras blancas nuevas, FT: fibras tónicas, N: núcleo, Mst: célula satélite (miocitosatelocito), Cst: célula satélite, Cp: capilar.

y atribuyéndoles diferentes funciones (Sänger y Stoiber, 2001).

3. CRECIMIENTO MUSCULAR EN ALEVINES, JUVENILES Y ADULTOS

Como ya se ha comentado anteriormente, el desarrollo de la musculatura implica procesos de diferenciación y crecimiento celular que no están restringidos a los estadios iniciales de vida larvaria. La capacidad de prolongar el crecimiento hiperplásico durante el periodo postlarvario es uno de los rasgos más llamativos del desarrollo muscular en muchos teleosteos. Cuando la capacidad hiperplásica de la musculatura se agota, el crecimiento del miotomo depende únicamente de un incremento en el diámetro de las fibras (hipertrofia). Esto limita el potencial de crecimiento total, ya que la capacidad hipertrofica de las fibras musculares también está limitada por el mayor diámetro fibrilar fisiológicamente eficiente. Según esto, el máximo tamaño que es capaz de alcanzar una especie está determinado en gran parte por el número y diámetro de las fibras la musculatura axial (Weatherley *et al.*, 1988).

En los teleosteos de gran tamaño final, el crecimiento hiperplásico de la musculatura en post-

larvas (alevines, juveniles y adultos), precisa de una continua génesis y diferenciación de nuevas fibras musculares. Esta miogénesis postlarvaria (3ª fase de crecimiento hiperplásico) tiene como particularidad que las fibras neoformadas, de pequeño tamaño, se entremezclan con las fibras preexistentes, confiriendo a la musculatura un aspecto morfológico de mosaico (Fig. 3b). Según esto, Rowleron y Veggetti (2001) han denominado a esta 3ª fase hiperplásica como *crecimiento en mosaico*. Stoiber y Sängner (1996) fundamentan esta hiperplasia postlarvaria en un proceso de migración de muchas de las células miogénicas responsables del crecimiento hiperplásico estratificado de la fase larvaria. La migración de estas células se realiza desde la periferia al interior del miotomo, aprovechando la expansión de tejido conectivo determinante de la formación de la lámina basal. Estas células migratorias, al quedar envueltas por la membrana basal de las fibras preexistentes se convierten en células miosatélites (Fig. 2e). No obstante, también pueden quedar envueltas aisladamente por su propia membrana basal (López-Albors *et al.*, 1998). La activación de las células miosatélites es la base celular que explica la continua génesis de nuevas fibras musculares durante el crecimiento hiperplásico en

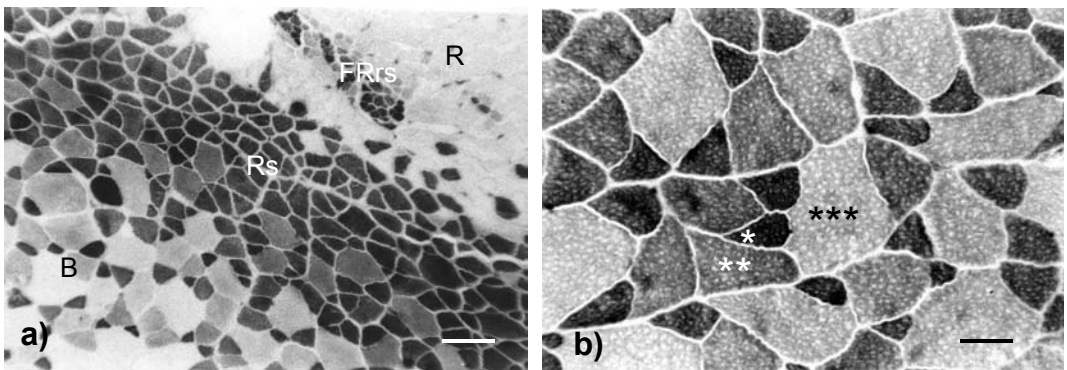


Figura 3. Musculatura de juvenil de lubina de 275d (\approx 50g). mATPasa pH 4.6 (10seg). a) Barra = 120 μ m. b) Detalle del músculo blanco: mosaico tintorial con fibras de alta *, moderada ** y baja *** actividad mATPasa. Barra = 60 μ m. B: músculo blanco, R: músculo rojo, Rs: músculo rosa, FRrs: fibras rojas de las rosetas.

mosaico. Como es fácil de deducir, la identidad de las células miosatélites es común al de todas las células miogénicas, esto es, la población de células precursoras musculares que, de forma más o menos predeterminada, dará lugar a una línea celular muscular cuando éstas sean activadas. Las células resultantes de la multiplicación de las células satélites pueden fusionarse entre sí para formar miotubos y finalmente nuevas fibras musculares. No obstante, también pueden unirse a fibras preexistentes para suplementar su número de núcleos y así permitir su continuo crecimiento hipertrófico (Fig. 2f).

Un mecanismo alternativo para explicar el crecimiento hiperplásico prolongado en algunos teleósteos es el “splitting” o rajamiento de las fibras maduras (Willemsse y Lieuwma-Noordanus, 1984; Romanello *et al.*, 1987). En estos estudios, mediante técnicas histoquímicas y electroforéticas, se demuestra que las fibras de nueva generación son idénticas a las demás preexistentes. Sin descartar que, en ciertos casos puntuales, el rajamiento de fibras pueda dar lugar a nuevas fibras hijas, actualmente esta propuesta no parece admitirse como explicación válida para la hiperplasia fisiológica postlarvaria de la musculatura axial.

La contribución relativa de la hiperplasia e hipertrofia al crecimiento muscular durante los períodos juvenil y adulto ha sido estudiada en muchas especies, habiéndose encontrado que la hipertrofia continúa incluso después de haber cesado el crecimiento por hiperplasia (Weatherley *et al.*, 1980, 1988; Stickland, 1983; Veggetti *et al.*, 1990, 1993; Kiessling *et al.*, 1991; Koumans *et al.*, 1993; Rowleron *et al.*, 1995; Veggetti *et al.*, 1999; Rowleron y Veggetti, 2001). De forma genérica, parece que en el músculo blanco de las especies de mayor y más rápido crecimiento se continúan generando nuevas fibras hasta un tamaño corporal de aproximadamente el 70% del tamaño final (Weatherley y Gill, 1985), mientras que en especies pequeñas o de crecimiento lento, éste pronto llega a ser consecuencia únicamente

del incremento en diámetro de las fibras, con poca o ninguna hiperplasia (Weatherley y Gill, 1987). Para una misma edad, los peces de crecimiento rápido generalmente muestran mayor hiperplasia que los de crecimiento lento (Weatherley *et al.*, 1979; Weatherley y Gill, 1987; Higgins y Thorpe, 1990; Kiessling *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 1999), lo que suele estar asociado a un mayor tamaño corporal en el momento del muestreo.

En la **lubina**, la fase postlarvaria comprende diferentes periodos. A nivel industrial, los *alevines* —de entre 2 y 20g—, se obtienen en “hatcheries” y “nurseries”, para ser habitualmente utilizados en la siembra de cultivos en jaulas (mar abierto), estuarios o tanques. Aunque su edad es variable, aproximadamente tienen de 4 a 8 meses. Los *juveniles* son peces mayores de 20-25g, que todavía no han alcanzado la madurez sexual. Las formas comerciales más habituales para el consumo son juveniles de 300 a 600g (lubina de ración). Por lo general, se considera que son peces inmaduros sexualmente, aunque hay que tener en cuenta que hasta un 20-30% de los machos de lubina de tamaño comercial son ya fértiles desde el primer invierno. Así pues, la *fase adulta* de la lubina varía en función del sexo, definiéndose en las hembras hacia los 3 años desde la eclosión, y en los machos un año antes, o incluso desde el primer año.

3.1. Madurez muscular en la lubina

En la musculatura axial de los alevines de **lubina** los tres estratos musculares fundamentales están perfectamente diferenciados: músculo rojo, intermedio y blanco (Fig. 3a). El **músculo rojo** se sitúa en la periferia del miotomo, engrosándose considerablemente a nivel del septo horizontal. Las fibras rojas presentan una morfología poligonal, abundantes mitocondrias y miofibrillas agrupadas en bucles o anillos. Su actividad mATPasa es alcalino y acidolábil (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998), y su perfil inmunohistoquímico positivo

ante sueros anti-S y anti-SHC. En ejemplares de 90-100 días, en la profundidad del músculo rojo, también se describen pequeñas agrupaciones de fibras con una actividad mATPasa moderada o intensa (López-Albors, 1994). Estas agrupaciones, también observadas en la dorada (López-Albors *et al.*, 1998; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998) aumentan progresivamente de tamaño y se expanden hacia los extremos del miotomo, siempre superficialmente al septo transversal. Por su morfología peculiar, a estas agrupaciones de fibras rojas no típicas se les ha denominado "fibras rojas de las rosetas" (Scapolo *et al.*, 1988; López-Albors *et al.*, 1998, Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998) (Fig. 3a). El último hecho destacable, que culmina el desarrollo del músculo rojo, es la adquisición de un aspecto tintorial en mosaico, evidenciado tras la reacción para la ATPasa miosínica. En un estudio previo, el mosaico del músculo rojo fue observado en lubinas de 230 días (López-Albors 1994), aunque su demostración es mucho más evidente en ejemplares de mayor edad (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998). Este mosaico tintorial está constituido por fibras aparentemente adultas, de las cuales, unas se muestran más acidoestables que otras. No obstante, mediante técnicas inmunohistoquímicas su existencia no ha sido demostrada (Scapolo *et al.*, 1988).

Como consecuencia del intenso crecimiento postlarvario de los alevines de lubina el **músculo blanco** adquiere pronto un aspecto morfológico en mosaico. En ejemplares de menos de 80 días, López-Albors *et al.* (2003) describen la existencia de fibras pequeñas entremezcladas con las fibras blancas adultas. No obstante, esta diferenciación es sólo morfológica, ya que desde un punto de vista histoquímico, la actividad mATPasa y la inmunoreactividad de todas ellas es semejante (Scapolo *et al.*, 1988; López-Albors *et al.*, 2003). En alevines de más de 100 días, la mATPasa ya revela la presencia de diferentes tonos tintoriales entre las fibras de pequeño, mediano y gran tamaño (Fig. 3b) (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998; López-Albors *et*

al., 2003). Este mosaico tintorial, no descrito por Scapolo *et al.* (1988) hasta los 20 meses, se inicia en la zona del músculo blanco próxima al músculo rosa, pero progresivamente se irá extendiendo a toda la amplitud del miotomo. Hay que mencionar, no obstante, que en una zona muy circunscrita del músculo blanco, cerca de sus extremos epi e hipoaxial, existe una agrupación de fibras con características histoquímicas semejantes a las de las fibras rosas (Scapolo *et al.*, 1988). Se constituye así, un pequeño acúmulo de fibras rosas que, atípicamente, se localizan en el músculo blanco.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado que, las fibras pequeñas de nueva generación del mosaico histoquímico del músculo blanco de la lubina juvenil presentan una inmunoreactividad diferente que las fibras blancas grandes (adultas) (Scapolo *et al.*, 1988). Si estas últimas sólo reaccionan positivamente ante sueros anti-F, las fibras pequeñas también reaccionan parcialmente ante sueros anti-S. Este hecho pone de manifiesto que, en ejemplares juveniles, en los que el mosaico del músculo blanco está perfectamente constituido, las fibras pequeñas de nueva generación presentan una diferente composición miosínica que las fibras pequeñas del mosaico del músculo blanco de los alevines (Scapolo *et al.*, 1988; López-Albors *et al.*, 2003). Probablemente, esta diferente composición miosínica sea una consecuencia del diferente origen miogénico de ambos tipos fibrilares. Así, en alevines, las fibras pequeñas del mosaico provienen directamente de la población original de mioblastos y se transforman rápidamente en fibras blancas adultas, mientras que las fibras pequeñas de los juveniles de más de 100 días provendrían de una activación de células miosatélites y adquieren una isoforma de miosina propia, que progresivamente se transformará en la de las fibras blancas adultas. Este doble origen de las fibras del mosaico ha sido también descrito en otros teleósteos como la anguila y la carpa (Rowlerson *et al.*, 1985; Romanello *et al.*, 1987; Alfei *et al.*, 1994).

3.2. Dinámica de crecimiento muscular

La dinámica de crecimiento muscular de los alevines y juveniles de lubina ha sido escasamente estudiada. A continuación se resumen los datos aportados por Veggetti *et al.* (1990) y Abdel (2004), así como algunos resultados nuestros aún no publicados.

El estudio del crecimiento muscular durante la fase postlarvaria debe ser relacionado con el crecimiento total de la lubina, el cual descri-

be diferencias importantes según la época del año. En el mar Mediterráneo, la época natural de puesta de la lubina se sitúa entre los meses de diciembre y marzo, lo cual determina que el periodo larvario finalice antes del inicio del verano. Durante el verano, cuando la temperatura del mar puede alcanzar los 26-28°C, los alevines de lubina crecen de forma muy rápida, llegando a pesar 50 g a comienzos del otoño. A partir de este momento, el crecimiento se va ralentizando, de tal forma que durante los meses

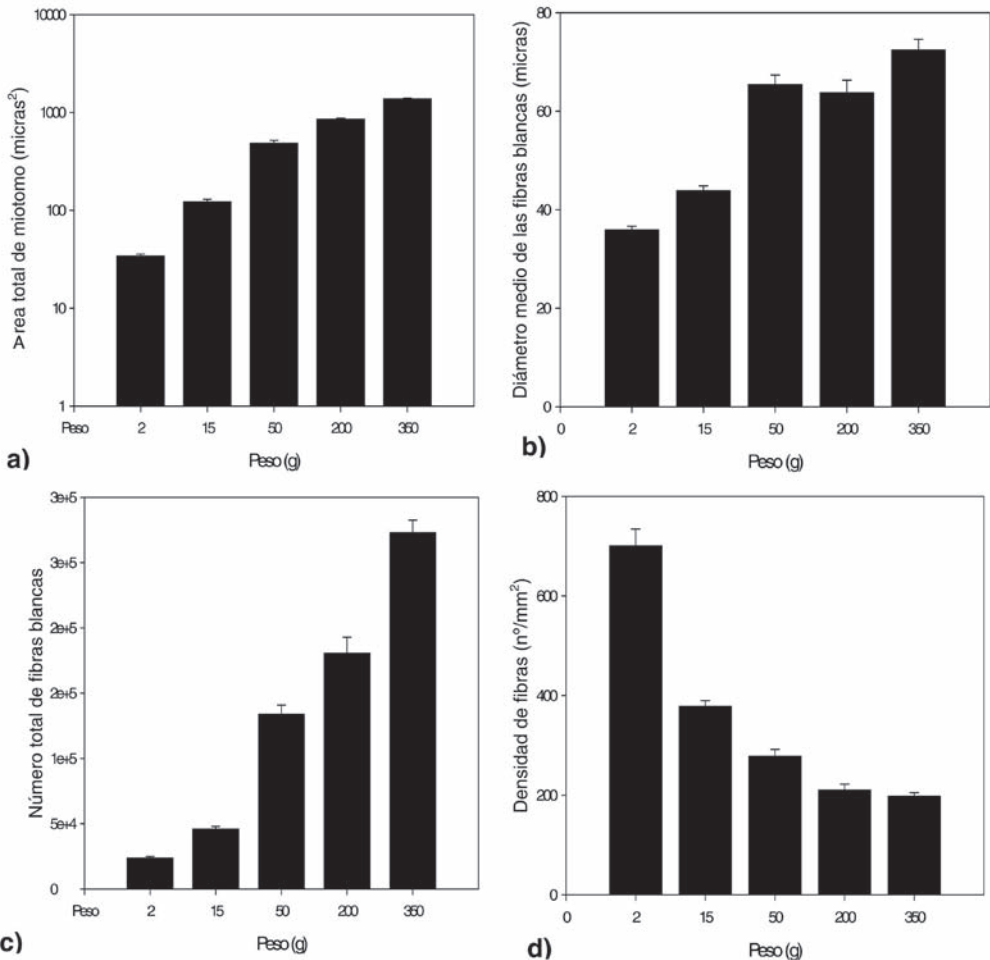


Figura 4. Crecimiento muscular de la lubina durante las fases alevín (2 y 15g) y juvenil (50, 200 y 350g). a) Crecimiento del músculo blanco (sección transversal), b) Hipertrofia de las fibras blancas, c) Hiperplasia del músculo blanco, d) Densidad de fibras blancas.

de invierno, el crecimiento de los juveniles de lubina es muy escaso, o incluso, en algunos casos negativo (Akbulut y Sahin, 1999). Durante el segundo año de vida, los juveniles de lubina siguen un nuevo ciclo de crecimiento en función de la estación del año, que en el caso de los machos puede estar influido negativamente por el comienzo de la maduración gonadal. El periodo comercial de la lubina se inicia y extiende a lo largo del segundo año de vida pudiéndose prolongar hasta el tercero.

Coincidiendo con la época estival, los alevines de lubina presentan un crecimiento muscular muy intenso como consecuencia de una importante actividad hipertrófica e hiperplásica en el músculo blanco (Fig. 4). Concretamente, el número estimado de fibras musculares blancas se puede duplicar de julio (2g con $\approx 23,800$ fibras) a septiembre (15g y $\approx 46,000$ fibras) (resultados no publicados) (Fig. 4c). En otoño, la intensidad de crecimiento muscular sigue siendo muy elevada. En el lote referido en la Fig.

4, a finales del mes de noviembre, el número de fibras blancas en los juveniles de 50g fue de $\approx 134,000$. Es interesante resaltar que la tasa de generación de nuevas fibras musculares fue mayor en esta época (15-50g) que durante el verano (2-15g) (Fig. 5). Paralelamente a la hiperplasia, en los alevines se evidencia un continuo crecimiento hipertrófico de la musculatura, reflejado tanto por los valores de la media del tamaño de las fibras blancas (Fig. 4b), como por las distribuciones de probabilidad de los diferentes tamaños fibrilares (Figs. 6 a,b). El desplazamiento de la media hacia la derecha en estas gráficas, así como el tamaño máximo de las fibras —menor de $120 \mu\text{m}$ de diámetro a los 2g, y $\approx 180 \mu\text{m}$ a los 50g— son pruebas evidentes del crecimiento hipertrófico acontecido.

La importancia del periodo estival para el crecimiento muscular de los juveniles de lubina en el mar Mediterráneo se pone también de manifiesto durante el segundo año de vida. Así, durante el segundo verano, lubinas mantenidas

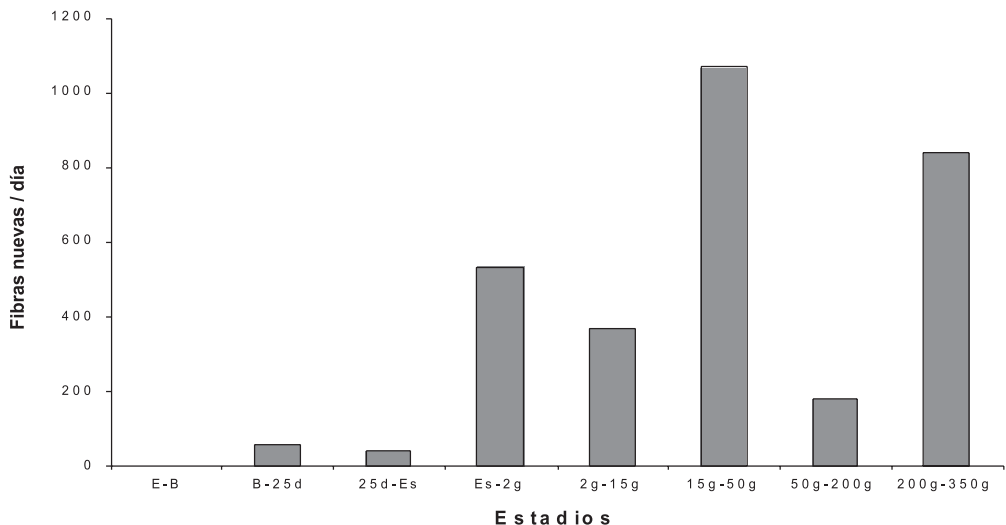


Figura 5. Tasas hiperplásicas del músculo blanco (nº de fibras nuevas/día) a lo largo de diferentes estadios de crecimiento de la lubina. El cómputo de días en cada uno de los estadios fue: 5d (eclosión-apertura de la boca E-B), 19d (apertura de la boca-25 días B-25d), 57d (25d-final fase larvaria 25d-Es), 38d (final fase larvaria-2g Es-2g), 60d (2-15g), 82d (15-50g), 258d (50-200g), 110d (200-350g).

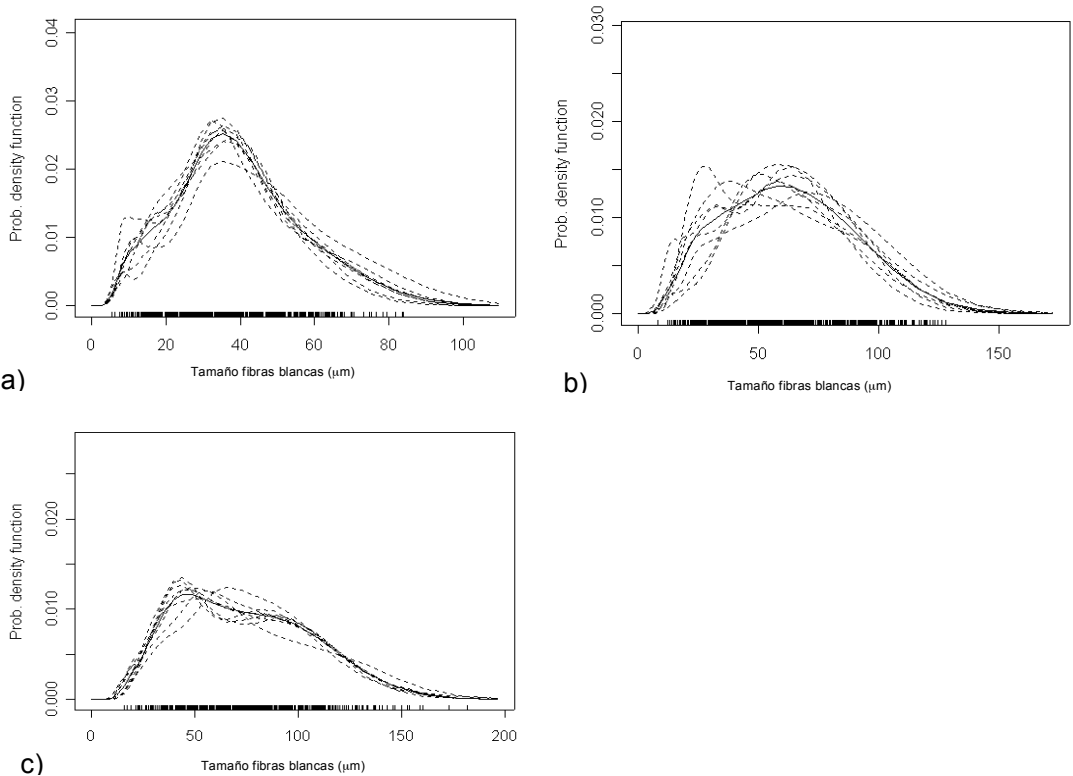


Figura 6. Funciones de densidad probable (Kernel) de los valores del diámetro fibrilar de una muestra representativa de fibras blancas (400-600) en cada pez. Cada línea punteada representa los valores en un pez, mientras que la línea continua representa la distribución media estimada de tamaños fibrilares del conjunto de los peces. a) 2g: se aprecia una acumulación de tamaños en torno a los 40µm y una intensa génesis de nuevas fibras blancas menores de 10 µm (hiperplasia). b) 50g: debido a la hipertrofia fibrilar, la media se sitúa ahora próxima a los 60 µm mientras que los valores máximos alcanzan tamaños fibrilares de hasta 180 µm de diámetro. Se mantiene una intensa actividad hiperplásica en la mayoría de los peces del grupo. c) 350g: como consecuencia de la elevada actividad hiperplásica del músculo blanco previa a este estadio, se aprecia una elevada proporción de fibras menores de 50µm, a la vez que, la continua hipertrofia de las fibras preexistentes aumenta los diámetros máximos (fibras más antiguas) hasta 200 µm.

a temperatura ambiente presentaron un importante crecimiento muscular como consecuencia de procesos muy activos de hipertrofia e hiperplasia de las fibras del músculo blanco (Abdel, 2004) (datos de 200 y 350g en Figs. 4, 5 y 6). Teniendo en cuenta que los ejemplares de

350g son de tamaño comercial, es interesante observar que su densidad de fibras fue de 200 fibras/mm² de sección transversal del filete.

Según se ha comentado anteriormente, el crecimiento hiperplásico de la musculatura axial en los teleosteos de gran tamaño final se man-

tiene activo hasta que éstos alcanzan aproximadamente el 70% de su tamaño final (Weatherley y Gill, 1985). En el salmón atlántico, el número máximo de fibras medido en diferentes lotes fluctuó entre un máximo de 1.010.000 (Johnston *et al.* 2002) y un mínimo de 582.000 (Johnston *et al.* 2004), lo cual pone de manifiesto la existencia de grandes diferencias intraespecíficas en la capacidad hiperplásica de esta especie. En la lubina, hasta el momento, no se han realizado estudios de cuantificación del número máximo de fibras blancas. Únicamente, Veggetti *et al.* (1990) apuntaron que el tamaño aproximado al cual se detiene la hiperplasia en la musculatura axial en esta especie es de unos 48 cm.

La densidad de fibras musculares es un parámetro morfométrico que representa de forma sencilla la distribución de tamaños de las fibras del músculo blanco. Además, es importante considerar que el tamaño de las fibras musculares es uno de los principales factores determinantes de la textura del filete en crudo. Como regla general, debe considerarse que a mayor densidad de fibras mayor firmeza del filete (Hatae *et al.* 1990; Hurling *et al.*, 1996). Esta premisa ha sido recientemente comprobada en la lubina (Periago *et al.* 2005), cumpliéndose que la densidad de fibras es capaz de explicar hasta un 46% de las variaciones en masticabilidad, encontrada en filetes crudos de lubina cultivada y salvaje.

La densidad fibrilar del músculo blanco es también importante para el procesado postmortem de los peces de acuicultura. A pesar de que actualmente la forma comercial mayoritaria de la lubina consiste en su venta de forma intacta, sin que se realice ningún procesado postmortem de la canal, parece probable que en un futuro la situación pueda cambiar hacia una tendencia a comercializar lubina fileteada. El tamaño de las fibras musculares podría incidir de forma significativa en las propiedades texturales del filete y, de forma particular, en su resistencia al agrietamiento ("gaping"). En el salmón atlántico, donde una parte considerable de la producción

se comercializa en ahumado y fileteado fino, el 40% de las pérdidas económicas por baja calidad durante el procesamiento secundario del salmón (fileteado y preparación del producto para el consumirlo) se han asociado a un agrietamiento del filete (Michie 2001). En esta misma especie, Johnston *et al.* (2002) determinaron que densidades de fibras en el músculo blanco mayores de 95 fibras/mm² son suficientes para disminuir de forma significativa los riesgos de agrietamiento del filete.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel I. 2004. Estructura muscular, composición y conformación en lubina *Dicentrarchus labrax* L., salvaje y cultivada a diferentes temperaturas. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Alfei, L., Onali, A., Spano, L., Colombari, P.T., Altavista, P.L. and De Vita, R. (1994). PCNA/cyclin expresión and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). Eur. J. Histochem. 38:151-162.
- Arizcun, M., López-Albors, O., García Alcázar, A., Orenes, M., Vázquez, J.M., and Abellán, E. 2005. Crecimiento del músculo blanco en larvas y postlarvas de dentón *Dentex dentex* L. Resúmenes del X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía.
- Akbulut, B. and Sahin, T. 1999. effect of weight loss occurring in winter season on growth of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in the Black Sea. Turk. J. Mar. Sci. 5(1):39-46.
- Ayala, M.D., López-Albors, O., Gil, F., Latorre, R., Vázquez, J.M., García-Alcázar, A., Abellán, E., Ramírez, G. and Moreno, F. 2000. Temperature effect on muscle growth of the axial musculature of the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Anat. Histo. Embryol. 29: 235-241.
- Ayala, M.D., López-Albors, O., Gil, F., García-Alcázar, A., Abellán, E., Alarcón, J.A.,

- Álvarez, M.C., Ramírez-Zarzosa, G. and Moreno, F. 2001. Temperature effects on muscle growth in two populations (Atlantic and Mediterranean) of sea bass. *Aquaculture* 202: 359-370.
- Blagden, C.S., Currie, P.D., Ingham, P.W. and Hughes, S.M. 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev.* 11: 2163-2175.
- Campion, D.R. 1984. The muscle satellite cell: A review. *International Review of Cytology*, 87: 225-251.
- Devoto, S.H., Melancon, E., Eisen, J.S. and Westerfield, M. 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*, 122: 3371-3380.
- Ekker, M., Wegner, J., Akimenko M.A. and Westerfield, M. 1992. Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes. *Development*, 116: 1001-10.
- Felsenfeld, A.L., Curry, M. and Kimmel, C.B. 1991. The *fub-I* mutation affecting myofibril structure in zebrafish muscle pioneer cells. *Devl. Biol.*, 148: 23-30.
- Goldspink, G. 1972. Postembryonic growth and differentiation of striated skeletal muscle. En "The Structure and Function of Muscle" (Bourne, G.H., Ed.), pp: 179-236. Academic Press, New York.
- Hatae, K., Yoshimatsu, F., Matsumoto, J.J., 1990. Role of muscle fibres in contributing firmness of cooked fish. *J. Food Sci.* 55, 693-696.
- Hatta, K., Bremiller, R., Westerfield, M. and Kimmel, C.B. 1991. Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development*, 112: 821-832.
- Higgins, P.J. and Thorpe, J.E. 1990. Hyperplasia and hypertrophy in the growth of skeletal muscle in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *J. Fish Biol.*, 37: 505-519.
- Hurling, R., Rodell, J.B., Hunt, H.D., 1996. Fibre diameter and fish texture. *J. Texture Studies* 27, 679.
- Johnston, I.A. 1993. Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae. *Marine Biology* 116: 363-379.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177: 99-115.
- Johnston, I.A., Vieira, V.L.A. and Abercromby, M. 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring *Clupea harengus*. *J. Exp. Biol.*, 198: 1389-1403.
- Johnston, I.A., Cole, N.J., Vieira, V.L.A. and Davidson, I. 1997. Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. *J. Exp. Biol.*, 200: 849-868.
- Johnston, I.A., Cole, N.J., Abercromby, M. and Vieira, V.L. 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *J. Exp. Biol.*, 201: 623-646.
- Johnston, I.A., Strugnell, G., McCracken, M.C. and Johnstone, R. 1999. Muscle growth and development in normal-sex ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.* 202: 1991-2016.
- Johnston, I.A., Mclay, H.A., Abercromby, M. and Robbins, D. 2000. Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellite cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. *J. Exp. Biol.* 203: 2539-2552.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Campbell, P., Mitchell, D., Whyte, D., Dingwall, A., Nickell, D., Selkirk, C. and Robertson, B. 2002. Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping. *Aquaculture* (210): 259-283.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Bickerdike, R., Dingwall, A., Luijckx, R., Campbell, P., Nickell, D., Alderson, R. 2004. Growth performance, muscle structure and flesh quality in out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts reared under two different photoperiod regimes. *Aquaculture* 237, 281-300.

- Kamler, E. 1992: Early life history of fish: an energetics approach. Eds. Chapman and Hall, London.
- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T. and Kiessling, K.H. 1991. Changes in the structure and function of the epiaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture* 93: 335-356.
- Killeen, J.R., MclayAY, H.A. and Johnston, I.A. 1999. Temperature and neuromuscular development in embryos of the trout (*Salmo trutta* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*
- Koumnas, J.T.M., Akster, H.A., Booms, G.H.R. and Osse, J.W.M. 1993. Influence of fish size on proliferation and differentiation of culture myosatellite cells of white axial muscle of carp (*Cyprinus carpio*). *Differentiation*, 53: 1-6.
- López Albors, O. 1994. Estructura, ultraestructura y dinámica de crecimiento de la musculatura lateral de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y la dorada (*Sparus aurata* L.) durante el desarrollo larvario y postlarvario. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- López Albors, O., Gil, F., Ramírez Zarzosa, G., Vázquez, J. M., Latorre, R., García Alcazar, A., Arencibia, A. and Moreno, F. 1998. Muscle development in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*, L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): further histochemical and ultrastructural aspects. *Anat. Histol Embryol.*, 27: 223-229.
- López Albors, O., Ayala, M.D., Gil, F., García Alcazar, A., Abellán, E., Latorre, R., Ramírez Zarzosa, G. And Vázquez, J. M. 2003. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibre of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juvenile stages. *Aquaculture* 220: 385-406.
- Mascarello, F., Romanello, M.G. and Scapolo, P.A. 1986. Histochemical and immunohistochemical profile of pink muscle fibres in some teleosts. *Histochem.*, 84: 251-255.
- Michie, I. 2001. Causes of downgrading in the salmon farmin industry. In *Fish Farmed Quality*, Blackwell Science: Oxford, pp.129-136.
- Nag, A.C. and Nursall, J.R. 1972. Histogenesis of white and red muscle fibres of trunk muscles of fish, *Salmo gairdneri*. *Cytobios.*, 6: 227-246.
- Periago, M^aJ., Ayala, M^aD., López-Albors, O., Abdel, I., Martínez, C., García-Alcázar, A., Ros, G., Gil, F., 2005. Muscle cellularity and flash quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 249:175-188
- Picket, G.D. and Pawson, M.G. 1994. Sea bass. Eds Chapman and Hall, London.
- Ramírez Zarzosa, G., Gil, F., Latorre, R., Ortega, A., García Alcázar, A., Abellán, E., Vázquez, J.M., López albors, O., Arencibia, A. and Moreno, F. 1995. The larval development of lateral musculature in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Cell Tissue Res.*, 280: 217-224.
- Ramírez Zarzosa, G., Gil, F., Vázquez, J.M., Arencibia, A., Latorre, R., López Albors, O., Ortega, A. and Moreno, F. 1998. The post-larval development of lateral musculature en gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) and sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) *Anat. Histol. Embryol.*, 27: 21-29.
- Romanello, M.G., Scapolo, P.A., Luprano, S. and Mascarello, F. 1987. Post-larval growth in the lateral white muscle of the eel, *Anguilla anguilla*. *J. Fish. Biol.*, 30: 161-172.
- Rowlerson, A. and Veggetti, A. 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: (ed. I.A. Johnston) *Muscle development and growth. Fish Physiology*. Academic Press. Vol. 18: 103-141.
- Rowlerson, A., Mascarello, A., Radaelli, G. and Veggetti, A. 1995. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.) II. Hyperplastic and hypertrophic growth

- of lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 16: 223-236.
- Sänger, A.M., Claassen, H. and Adam, H. 1988. The arrangement of muscle fiber types in the axial muscle of various cyprinids (Teleostei). *Zool. Anz.*, 221: 44-49.
- Sänger, A.M. and Stoiber, W. 2001. Muscle fiber diversity and plasticity. In: (ed. I.A. Johnston) *Muscle development and growth. Fish Physiology. Academic Press. Vol. 18: 187-250.*
- Scapolo, P.A., Veggetti, A., Mascarello, F. and Romanello, M.G. 1988. Developmental transitions of myosin isoforms and organization of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embryol.*, 178: 287-295.
- Stickland, N.C. 1983. Growth and development of the muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Anat.*, 137 (2): 323-33.
- Stoiber, W., and Sänger, A.M. 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibres in teleost fish. *Anat. Embryol.*, 194: 569-579.
- Stoiber, W., Haslett, J.R., Goldschmid, A. and Sänger, A.M. 1998. Patterns of superficial fibre formation in the european pearlfish (*Rutilus frisii meidingeri*) provide a general template for slow muscle development in teleost fish. *Anat. Embryol. (Berl)* 197: 485-496.
- Talesara, C.L. and Urfi, A.J. 1987. A histophysiological study of muscle differentiation and growth in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Var. communis. J. Fish Biol.*, 31: 45-54.
- Te Kronnie, G. 2000. Axial muscle development in fish. *Basic Appl. Myol.* 10(6): 261-267.
- Usher, M.L., Stickland, N.C. and Thorpe, J.E. 1994. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. *J. Fish Biol.*, 44: 953-964.
- Valente, L.M.P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., Silva, M.W., Olivereira, M.H., Monteiro, R.A.F. and Fauconneau, B. 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow- growing strains of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 55: 675-691.
- Van Raamsdonk, W., Van Der Stelt, A., Diegenbach, P.C., Van Der Berg, W., De Beryn, H., Van Dijk, J. and Mijzen, P. 1974. Differentiation of the musculature of the teleost *Brachydanio rerio*. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, 145: 321-342.
- Van Raamsdonk, W., Pool, C.W. and Te Kronnie, G. 1978. Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Z. Anat. Embryol.*, 153: 137-155.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A. and Rowleron, A. 1990. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.): An ultrastructural and morfometric study. *Anat. Embryol.*, 182: 1-10.
- Veggetti, A., Rowleron, A., Radaelli, G., Arrighi, S. and Domeneghini, C. 1999. Posthatching development of the gut and lateral muscle in the sole, *Solea solea* (L.). *J. Fish Biol.* 55 (Suppl.A): 44-65.
- Watabe, S. 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55 (Suppl. A): 1-18.
- Watabe, S. 2001. In "Muscle Development and Growth", Ch. 2. (Johnston, I., ed.), San Diego, California.
- Waterman, R.E. 1969. Developmental of the lateral musculature in the teleost, *Brachydanio rerio*: A fine structural study. *Am. J. Anat.*, 125: 457-494.
- Weatherley, A.H. and Gill, H.S. 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia*, 41: 353-4.
- Weatherley, A.H. and Gill, H.S. 1987. *The Biology of fish growth.* London: Academic press, 443pp.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. and Rogers, S.C. 1979. Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to so-

- matic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.*, 57: 2385-92.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. and Rogers, S.C. 1980. The relationship between mosaic muscle fibres and size in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, 17: 603-10.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. and Lobo, A.F. 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J. Fish Biol.*, 33: 851-859.
- Wilkes, D., Xie, S.Q., Stickland, N.C., Alami-Durante, H., Kentouri, M., Sterioti, A., Koumoundouros, G., Fauconneau, B. and Goldspink, G. 2001. Temperature and myogenic factor transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Biol.*, 204: 2763-2771.
- Willemse, J.J. and Lieuwma-Noordanus, C. 1984. The generation of new "white" muscle fibers by budding in the lateral musculature of elvers *Anguilla anguilla* (L.) during normal development. *Experientia*, 40: 990-992.