

## Influence of partial replacement of fish meal and fish oil with vegetable products on the growth and muscle cellularity of juvenile shi drum, *Umbrina cirrosa*

## Influencia del reemplazo parcial de la harina y el aceite de pescado por productos vegetales en el crecimiento y la celularidad muscular de juveniles de verrugato, *Umbrina cirrosa*

María D Ayala<sup>1\*</sup>, David Erades<sup>1</sup>, Sara Villafranca<sup>1</sup>, Marta Arizcun<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain.

<sup>2</sup> Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Murcia, Puerto de Mazarrón, 30860 Murcia, Spain.

\* Corresponding author. E-mail: mdayala@um.es

**ABSTRACT.** Seven-month-old shi drum (*Umbrina cirrosa*) specimens (mean weight 18.98 g, mean length 11.80 cm) were classified into 2 groups, a control group (C) fed a standard diet and a vegetal group (V) fed a diet with partial replacement of fish meal and fish oil by vegetable products. The body and muscle parameters were studied on days 0, 27, and 62 of the experiment. On day 27, body length was similar in both groups, but body weight was significantly lower in group V than in group C. The transverse area of the white muscle was also significantly lower in V than in C. Hypertrophy was higher in C than in V, whereas hyperplasia was higher in V than in C. On day 62, the body parameters showed similar results to those found on day 27. Muscle cellularity was different from that found on day 27, since hypertrophy was higher in V than in C and hyperplasia was higher in C than in V. The feed conversion rate and specific growth rate were similar in both groups, but the daily intake rate was lower in V than in C. Therefore, it seems that the percentage of vegetables in the vegetal feed was excessively high and this caused less acceptance by the fish. The hepatosomatic, viscerosomatic, and intestinal length indices were similar in both groups. Survival was nearly 100% in both groups.

**Key words:** feeding groups, vegetal diet, growth, muscle cellularity, shi drum.

**RESUMEN.** Verrugatos (*Umbrina cirrosa*) de 7 meses (peso medio de 18.98 g, longitud media de 11.80 cm) fueron clasificados en 2 grupos: un grupo control (C), que fue alimentado con una dieta estándar, y un grupo vegetal (V), que fue alimentado con una dieta con reemplazo parcial de harina y aceite de pescado por productos vegetales. Los parámetros corporales y musculares se estudiaron en los días 0, 27 y 62 del experimento. En el día 27, la longitud corporal fue similar en ambos grupos, pero el peso fue significativamente menor en el grupo V que en el C. El área transversa del músculo blanco fue significativamente menor en V que en C. La hipertrofia fue mayor en C que en V, mientras que la hiperplasia fue mayor en V que en C. En el día 62, los parámetros corporales mostraron resultados similares a los encontrados en el día 27. La celularidad muscular fue diferente a la encontrada en el día 27, de manera que la hipertrofia fue mayor en V que en C y la hiperplasia fue mayor en C que en V. La tasa de conversión de alimento y la tasa específica de crecimiento fueron similares en ambos grupos, pero la tasa diaria de alimentación fue menor en V que en C. Así, parece ser que el porcentaje de vegetales en la dieta vegetal fue excesivamente alto y ello causó menor aceptación por los peces. Los índices hepatosomáticos, digestosomáticos e intestinales fueron similares en ambos grupos. La supervivencia fue próxima al 100% en ambos grupos.

**Palabras clave:** grupos de alimentación, dieta vegetal, crecimiento, celularidad muscular, verrugato.

### INTRODUCTION

Currently, the aquaculture industry is the main consumer of fish meal, a protein-rich feedstuff that approximates the ideal amino acid profile of most cultured species. Fish meal, however, is a limited resource. Also, the inherent variability in fish meal composition by species, season, geographic origin, and processing method leads to variations in quality. The essential polyunsaturated fatty acids 20:5n-3 (eicosapentaenoic acid) and 22:6n-3 (docosahexaenoic acid) are critical nutrients in fish nutrition but cannot be synthesized

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, la industria de la acuicultura es el principal consumidor de harina de pescado, un alimento rico en proteínas que se aproxima al perfil ideal de aminoácidos de la mayoría de las especies cultivadas. Sin embargo, la harina de pescado es un recurso limitado. Además, la variabilidad inherente en la composición de la harina de pescado debido a las especies, la estación, el origen geográfico y el procesamiento conduce a una variación en la calidad. Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales 20:5n-3 (ácido eicosapentaenoico) y

by most marine fish; hence, their inclusion in the diet is necessary. The traditional source of these fatty acids is derived from fish oil (Izquierdo 1996), but the high demand for this limited supply, which is obtained from catches of wild fishes, significantly increases its price and limits its use in the aquaculture feed industry (Izquierdo et al. 2005). Another limitation in the use of fish oil is the difficulty in maintaining polyunsaturated fatty acids stable, since they are readily oxidizable. The quality of fish oil depends on the fishing season and the species from which it is obtained. In addition, fish oil can be contaminated by environmental pollutants such as polychlorinated biphenyls, which may contain dioxins. Purification of polyunsaturated fatty acids from fish oil is difficult to achieve because of their variable lengths and degree of unsaturation (Sijtsma and Swaaf 2004). Given the limitations of fish oil, alternative products of vegetable origin as sources of these 2 types of fatty acids are currently being searched.

The replacement of fish meal with sustainable and eco-friendly plant protein sources has been tested on different species without affecting growth performance (Kaushik et al. 2004, Pratoomyot et al. 2010, Johnsen et al. 2011, Perera et al. 2019). Benedito-Palos et al. (2016) studied the effect of diets with low contents of fish meal and fish oils on juvenile gilthead sea breams, *Sparus aurata*, for 8 months and observed that the efficiency of diets with moderate substitution of ingredients of animal origin was comparable to that of the control diets. Similar results were also found by Simó-Mirabet et al. (2018) for juvenile gilthead sea breams fed with plant-based diets from early stages to sexual maturity.

The shi drum, *Umbrina cirrosa* L., is a member of the Sciaenidae family. This species is an emerging candidate for Mediterranean aquaculture because of its high growth rate, adaptability to culture conditions, and high market price (Mylonas et al. 2004). Reproduction without hormonal induction has already been achieved for shi drum born in captivity (Arizcun-Arizcun et al. 2014). So far, some studies on its nutritional requirements (Akpınar et al. 2012, Morgane and Fountoulaki 2014, Sevgili et al. 2015) and on the use of plant sources (soybean and cereals) in its diet (Segato et al. 2005, 2008) have showed that the shi drum can tolerate a relatively high inclusion of plant products without having negative effects on growth and feed efficiency. For juvenile meagre (*Argyrosomus regius*), a sciaenid with similar characteristics to the shi drum, Ribeiro et al. (2015) studied the effect of vegetable-based diets on growth, intestinal parameters, and hematological stress indicators over a period of 88 d and found that growth was not significantly affected by the replacement of fish meal and fish oil with the alternative ingredients.

It seems that it is possible to increase the percentage of plant products in fish diets without reducing growth (Segato et al. 2005, 2008; Ribeiro et al. 2015). It is now necessary to deepen into the specific needs of each species to optimally

22:6n-3 (ácido docosaheptaenoico) son nutrientes críticos en la nutrición de los peces, pero no pueden ser sintetizados por la mayoría de los peces marinos; por lo tanto, su inclusión en la dieta es necesaria. La fuente tradicional de estos ácidos grasos deriva del aceite de pescado (Izquierdo 1996), pero la alta demanda de este suministro limitado, obtenido de las capturas de peces silvestres, aumenta significativamente su precio y limita su uso en la industria de alimento para la acuicultura (Izquierdo et al. 2005). Otra limitación en el uso del aceite de pescado es la dificultad de mantener ácidos grasos poliinsaturados estables, ya que son fácilmente oxidables. La calidad del aceite de pescado depende de la temporada de pesca y de la especie de la que se obtiene. Además, el aceite de pescado puede estar contaminado de sustancias en el ambiente como los bifenilos policlorados, que pueden contener dioxinas. La purificación de los ácidos grasos poliinsaturados del aceite de pescado es difícil debido a su longitud variable y grado de insaturación (Sijtsma y Swaaf 2004). Dadas las limitaciones del aceite de pescado, actualmente se buscan productos alternativos de origen vegetal que proporcionen las fuentes de estos 2 tipos de ácidos grasos.

La sustitución de la harina de pescado por fuentes de proteínas vegetales sostenibles y ecológicas se ha llevado a cabo en diferentes especies sin afectar el rendimiento del crecimiento (Kaushik et al. 2004, Pratoomyot et al. 2010, Johnsen et al. 2011, Perera et al. 2019). Benedito-Palos et al. (2006) estudiaron el efecto de las dietas con bajo contenido de harina y aceite de pescado en juveniles de dorada, *Sparus aurata*, durante 8 meses y observaron que las dietas con una sustitución moderada de ingredientes de origen animal producían una eficiencia similar a la obtenida con las dietas de control. Simó-Mirabet et al. (2018) encontraron resultados similares para juveniles de dorada alimentados con dietas basadas en plantas desde las primeras etapas hasta la madurez sexual.

El verrugato, *Umbrina cirrosa* L., es un miembro de la familia de los esciéndidos. Esta especie es un candidato emergente para la acuicultura mediterránea debido a su alta tasa de crecimiento, adaptabilidad a las condiciones de cultivo y alto precio de mercado (Mylonas et al. 2004). Ya se ha logrado la reproducción, sin inducción hormonal, de ejemplares de esta especie nacidos en cautividad (Arizcun et al. 2014). Hasta ahora, algunos estudios sobre sus necesidades nutricionales (Akpınar et al. 2012, Morgane y Fountoulaki 2014, Sevgili et al. 2015) y sobre el uso de fuentes vegetales (productos de soya y cereales) en su dieta (Segato et al. 2005, 2008) han demostrado que el verrugato tolera una inclusión relativamente alta de productos vegetales sin tener efectos negativos en el crecimiento y la eficiencia alimenticia. En juveniles de corvina (*Argyrosomus regius*), un esciéndido de características similares al verrugato, Ribeiro et al. (2015) estudiaron el efecto de las dietas basadas en vegetales sobre el crecimiento, los parámetros intestinales y los indicadores de estrés hematológico durante 88 d y encontraron que el crecimiento de la corvina no se vio afectado significativamente por el

formulate feeds. On the other hand, studies on the muscle cellularity of fish fed vegetable diets are scarce, with the few exceptions including a study on the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) by Valente et al. (2016), who found that the full replacement of animal proteins with vegetable proteins resulted in fish having small fiber sizes. So far, this type of study has not been carried out on the shi drum. Therefore, in this study we have assessed the influence of the partial dietary replacement of fish meal and fish oil with vegetal products on muscle cellularity in juvenile shi drum and the influence of this diet on growth and nutrient utilization performance.

## MATERIALS AND METHODS

### Feeding trial

An experiment was carried out with a population of juvenile shi drum (*U. cirrosa*) specimens obtained in May 2018 from a stock of spawners adapted to captivity at the Instituto Español de Oceanografía (Centro Oceanográfico de Murcia, Mazarrón, Spain). Juvenile specimens (7 months old) weighing  $18.98 \pm 1.20$  g (mean  $\pm$  SD) and measuring  $11.80 \pm 0.50$  cm (mean total length  $\pm$  SD) were initially fed with a commercial standard diet (Skretting España SA). At the beginning of the study (day 0 of the experiment), 270 specimens were randomly distributed into 2 feeding groups (135 fish per group). Each group was distributed in three 170-L tanks (45 fish per tank) in a flow-through system. Water flow rate in each tank was about 250 L/h. Natural photoperiod conditions were applied throughout the experiment, which varied between 10L:14D and 11L:13D. Light intensity was 250 lux. Rearing temperature was kept between 18 and 20 °C to ensure food intake by the fish.

### Experimental diets

The control fish received a commercial standard diet (Skretting España SA) (group C) and the experimental fish received a vegetal-based diet (group V). The standard or conventional diet (diet for group C) was formulated and manufactured for gilthead sea bream, but it was used for the shi drum because there is still no commercial feed for this species. The vegetal diet (diet for group V) was formulated and delivered by Biomar (Denmark) and has been used for juvenile sea bream in previous studies (Benedito-Palos et al. 2016, Simó-Mirabet et al. 2018, Perera et al. 2019). The diet for group V included partial replacement of fish meal and fish oil with vegetal products at an 84% inclusion level. Pellet size was 2 mm in both the diet for group C and the diet for group V.

The ingredients in the diet for group C were fish meal, fish oil, oilseeds, cereal grains, blood products, chicken flour, soybean and rapeseed oils, calcium, phosphorus, vitamin-mineral mix, and antioxidant and antifungal additives. The

reemplazo de la harina y el aceite de pescado por ingredientes de origen vegetal.

Parece que es posible aumentar el porcentaje de productos vegetales en la dieta de los peces sin reducir el crecimiento (Segato et al. 2005, 2008; Ribeiro et al. 2015). Ahora es necesario profundizar en las necesidades específicas de cada especie para formular un pienso óptimo. Por otro lado, existe una escasez de estudios sobre la celularidad muscular de los peces alimentados con una dieta vegetal, con algunas excepciones, como el estudio de Valente et al. (2016) en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), en el cual el reemplazo total de la proteína animal por proteína vegetal dio como resultado peces con tamaños fibrilares pequeños. Hasta ahora, este tipo de estudio no se ha llevado a cabo en el verrugato. Por ello, en este trabajo hemos estudiado la influencia de la sustitución dietética parcial de la harina y el aceite de pescado por productos vegetales en la celularidad muscular de juveniles de verrugato y la influencia de esta dieta en el crecimiento y el rendimiento de la utilización de los nutrientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Prueba de alimentación

Se realizó un experimento con una población de juveniles de verrugato (*U. cirrosa*) obtenidos en mayo de 2018 de una población de reproductores adaptados a la cautividad en el Instituto Español de Oceanografía (Centro Oceanográfico de Murcia, Mazarrón, España). Los especímenes juveniles (7 meses de edad), que pesaban  $18.98 \pm 1.20$  g (media  $\pm$  DE) y medían  $11.80 \pm 0.50$  cm (longitud total media  $\pm$  DE), se alimentaron inicialmente con una dieta estándar comercial (Skretting España SA). Al comienzo del estudio (día 0 del experimento), se distribuyeron al azar 270 especímenes en 2 grupos de alimentación (135 peces por grupo). Cada grupo se distribuyó en 3 tanques de 170 L (45 peces por tanque) en un sistema de flujo continuo. El caudal de agua en cada tanque era de aproximadamente 250 L/h. Se aplicaron condiciones de fotoperíodo natural durante todo el experimento, que varió entre 10L:14D y 11L:13D. La intensidad de la luz fue de 250 lux. La temperatura de cultivo se mantuvo entre 18 y 20 °C para garantizar la ingesta de alimentos por parte de los peces.

### Dietas experimentales

El grupo control recibió una dieta estándar comercial (Skretting España SA) (grupo C) y el grupo experimental recibió una dieta basada en vegetales (grupo V). La dieta estándar o convencional (dieta para el grupo C) se formuló y fabricó para la dorada, pero fue utilizada para el verrugato porque todavía no hay pienso comercial para esta especie. La dieta vegetal (dieta para el grupo V) fue formulada y entregada por Biomar (Dinamarca) y se ha utilizado para doradas juveniles en estudios anteriores (Benedito-Palos et al. 2016,

ingredients in the diet for group V were fish meal, fish oil, soy protein, corn gluten, wheat gluten, rapeseed cake, wheat flour, rapeseed oil, palm olein, monocalcium phosphate, histidine, yttrium, vitamin–mineral mix, amino-acid and micronutrient mix, and antioxidants. The proximate compositions and percentages of the main ingredients in the diets are shown in Tables 1 and 2. For details on the composition of the diet for group V see also Benedito-Palos et al. (2016). Experimental diets were fed *ad libitum* 3 times a day for 62 d (end of the experiment).

## Samplings

Sampling was carried out on day 0 of the experiment (when specimens were 7 months old and had not yet been classified into 2 different dietary groups), on day 27 (when specimens were 8 months old), and on day 62 (when specimens were 9 months old and the experiment came to an end). Fish body length and weight were individually measured on sampling days. The following parameters were also calculated after sampling on day 27 and day 62: feed conversion rate (FCR): total amount of consumed feed/weight gain; specific growth rate (SGR) (% per day):  $100 \times [(\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight})/\text{days}]$ ; condition factor (CF) ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ):  $100 \times (\text{body weight}/\text{length}^3)$ ; and daily intake rate (DIR) (% per day):  $\{\text{supplied feed}/[(\text{initial weight} + \text{final weight})/2]\text{days}\} \times 100$ . For the final sampling, the organosomatic indices (hepatosomatic index, HSI; viscerosomatic index, VSI; and intestine length index, ILI) were also determined from 5 fish per tank (15 fish per group). Each organosomatic index was calculated as follows: HSI (%) =  $100 \times (\text{liver weight}/\text{fish weight})$ ; VSI (%) =  $100 \times (\text{digestive weight}/\text{fish weight})$ ; and ILI (%) =  $100 \times (\text{intestinal length}/\text{fish length})$ .

Muscle parameters were measured from 10 fish on day 0, 12 fish per group (4 fish per tank) on day 27, and 12 fish per group (4 fish per tank) on day 62. Percent survival was calculated for both groups at the end of the experiment. On each sampling day, the specimens used for the muscle analysis were slaughtered by an overdose of anesthesia with 60 ppm of clove oil and then shipped to the Faculty of Veterinary Sciences at Murcia (Spain).

**Table 1.** Proximal composition of the control and vegetal diets.  
**Tabla 1.** Composición proximal de las dietas (control y vegetal).

Composition (%)	Control diet	Vegetal diet
Protein	48	50.2
Fat	18	21.9
Humidity	10	8.2
Cellulose, ashes, and nitrogen-free extract	24	19.7

Simó-Mirabet et al. 2018, Perera et al. 2019). La dieta para el grupo V fue una dieta con un reemplazo parcial de harina y aceite de pescado por productos vegetales con un nivel de inclusión al 84%. El tamaño de los gránulos fue de 2 mm tanto en la dieta para el grupo C como en la dieta para el grupo V.

Los ingredientes de la dieta para el grupo C fueron harina de pescado, aceite de pescado, semillas oleaginosas, granos de cereales, productos derivados de la sangre, harina de pollo, aceite de soya y de colza, calcio, fósforo, mezcla de vitaminas y minerales, y aditivos antioxidantes y antifúngicos. Los ingredientes de la dieta V fueron harina de pescado, aceite de pescado, proteína de soya, gluten de maíz, gluten de trigo, torta de colza, harina de trigo, aceite de colza, oleína de palma, fosfato monocálcico, histidina, itrio, mezcla de vitaminas y minerales, mezcla de aminoácidos y micronutrientes, y antioxidantes. La composición proximal y el porcentaje de los ingredientes principales de ambas dietas se muestran en las Tablas 1 y 2. Los detalles de la composición de la dieta V se pueden consultar en Benedito-Palos et al. (2016). Las dietas experimentales fueron administradas *ad libitum* 3 veces al día durante 62 d (final del experimento).

## Muestras

Los muestreos se llevaron a cabo en el día 0 del experimento (cuando los ejemplares tenían 7 meses de edad y aún no habían sido clasificados en 2 grupos alimenticios diferentes), en el día 27 (cuando los ejemplares tenían 8 meses de edad) y en el día 62 (cuando los ejemplares tenían 9 meses de edad y fue el final del experimento). La longitud y el peso de los peces se midieron individualmente durante los días de muestreo. Además, se calcularon los siguientes parámetros después de los muestreos en los días 27 y 62 del experimento: tasa de conversión de alimento (TCA): cantidad total de alimento consumido/aumento de peso; tasa de crecimiento específico (TCE) (porcentaje por día):  $100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})/\text{días}]$ ; factor de condición (FC) ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ):  $100 \times (\text{peso corporal}/\text{longitud}^3)$ ; y tasa de ingesta diaria (TID) porcentaje por día:  $\{\text{alimento administrado}/[(\text{peso inicial} + \text{peso final})/2]\text{ días}\} \times 100$ . En el muestreo final también se determinaron los índices organosomáticos (índice hepatosomático, IHS; índice digestosomático, IDS; y el índice de longitud intestinal, ILI) a partir de 5 peces por tanque (15 peces por grupo). Cada índice organosomático se calculó de la siguiente manera: IHS (%) =  $100 \times (\text{peso del hígado}/\text{peso del pez})$ ; IDS (%) =  $100 \times (\text{peso del aparato digestivo}/\text{peso del pez})$ ; e ILI (%) =  $100 \times (\text{longitud intestinal}/\text{longitud del pez})$ .

Los parámetros musculares se midieron en 10 peces el día 0, en 12 peces por grupo (4 peces por tanque) el día 27 y en 12 peces por grupo (4 peces por tanque) el día 62. El porcentaje de supervivencia se calculó para ambos grupos al final del experimento. En cada día de muestreo, los peces utilizados para el análisis muscular se sacrificaron por sobredosis de anestesia con 60 ppm de aceite de clavo y se transportaron a la Facultad de Veterinaria de Murcia (España).



**Table 2.** Percent fish meal and fish oil vs vegetal meal and vegetal oil in each diet (control and vegetal).**Tabla 2.** Porcentajes de harina y aceite de pescado vs harina y aceite vegetales en cada dieta (control y vegetal).

Ingredients	Control diet	Vegetal diet
Fish meal	15.0	3.0
Vegetal meal	71.7	79.3
Fish oil	6.1	2.5
Vegetal oil	6.0	12.0
Vitamins and minerals mix <sup>a</sup>	1.2	0.5
Amino-acid and micronutrient mix <sup>b</sup>		2.7

<sup>a</sup>Contents in the control diet: vitamin A = 40,000 IU, vitamin D3 = 750 IU, vitamin C = 160 ppm, vitamin E = 150 ppm, copper = 5 mg/kg, zinc = 90 mg/kg, magnesium = 57 ppm, iron = 40 mg/kg, manganese = 15 mg/kg, iodine = 2 mg/kg, selenium = 20 mg/kg. Contents in the vegetal diet: calcium = 689 g/kg, sodium = 108 g/kg, iron = 3 g/kg, manganese = 1 g/kg, zinc = 1 g/kg, cobalt = 2 mg/kg, iodine = 2 mg/kg, selenium = 20 mg/kg, molybdenum = 32 mg/kg, retinyl acetate = 1 g/kg, DL-cholecalciferol = 2.6 g/kg, DL- $\alpha$  tocopheryl acetate = 28 g/kg, ascorbic acid = 16 g/kg, thiamin = 0.6 g/kg, riboflavin = 1.7 g/kg, pyridoxine = 1.2 g/kg, vitamin B12 = 50 mg/kg, nicotinic acid = 5 g/kg, pantothenic acid = 3.6 g/kg, folic acid = 0.6 g/kg, biotin = 50 mg/kg.

<sup>b</sup>Contains methionine, lysine, choline, and lecithin.

### Quantitative analysis of muscle growth

After obtaining the body length and weight parameters, cross sections of the specimens were made and whole body slices 5 mm thick were obtained. The entire muscle cross sections from every fish were photographed for measurement by a morphometric analysis system (Sygma-Scan Pro\_5). These body slices were subsequently cut into smaller blocks and then snap-frozen in 2-methylbutane over liquid nitrogen. Sections 8  $\mu$ m thick were later obtained from those frozen blocks with a cryostat (Leica CM 1850) and stained with hematoxylin-eosin for morphometric studies. Muscle growth was quantified by means of the morphometric analysis system. The following parameters were measured: total cross-sectional area of the white muscle, number of white muscle fibers, size (area and minor axis length) of white muscle fibers, and muscle fiber density (number of white fibers/ $\mu$ m<sup>2</sup>). Average size was estimated from ~600 fibers ( $\pm$ 10 SD) located at the intermediate and apical sectors of the epaxial quadrant of the myotome cross section according to the methodology described by Ayala et al. (2013, 2015) for this species.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS Statistics 24. Mean and standard deviation (SD) values were

### Análisis cuantitativo del crecimiento muscular

Después de medir los parámetros de longitud y peso corporal, a todos los especímenes se les realizó una sección transversal al eje longitudinal del cuerpo y se obtuvieron cortes de 5 mm de espesor. Las secciones musculares transversales completas de cada pez se fotografiaron para su medición mediante un sistema de análisis morfométrico (Sygma-Scan Pro\_5). Posteriormente, estas secciones corporales se cortaron en bloques más pequeños y se congelaron instantáneamente en 2-metilbutano sobre nitrógeno líquido. Posteriormente, de esos bloques congelados, se obtuvieron secciones de 8  $\mu$ m de espesor con un criostato (Leica CM 1850) y se tiñeron con hematoxilina-eosina para los estudios morfométricos. El crecimiento muscular se cuantificó mediante el sistema de análisis morfométrico. Se midieron los siguientes parámetros: área transversa total del músculo blanco, número de fibras musculares blancas, tamaño (área y longitud del eje menor) de fibras musculares blancas y densidad de fibras musculares (número de fibras blancas/ $\mu$ m<sup>2</sup>). El tamaño medio de las fibras se estimó a partir de ~600 fibras ( $\pm$ 10 DE) ubicadas en los sectores intermedio y apical del cuadrante epiaxial de la sección transversa del miotomo, de acuerdo con la metodología descrita por Ayala et al. (2013, 2015) para esta especie.

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistics SPSS 24. Se calculó el valor medio y la desviación estándar (DE) de cada grupo de datos. La distribución de datos se analizó para cada día de muestreo mediante la prueba de Shapiro–Wilk ( $P < 0.05$ ). Con relación al tamaño de las fibras, los datos no mostraron una distribución normal ( $P < 0.05$ ) y la prueba de Levene tampoco mostró variaciones homogéneas ( $P < 0.05$ ). Por ello, se utilizaron pruebas no paramétricas (pruebas de Mann–Whitney y Kolmogorov–Smirnov) para evaluar el efecto de la dieta sobre el tamaño de las fibras ( $P < 0.05$ ). Para la mayoría del resto de los parámetros, ambas pruebas (Shapiro–Wilk y Levene) mostraron valores de  $P > 0.05$  y, por ello, se utilizó el análisis de varianza; no obstante, en los casos con valores de  $P < 0.05$  se utilizaron pruebas no paramétricas.

## RESULTADOS

### Crecimiento corporal e índices organosomáticos

Antes del comienzo del experimento, todos los ejemplares habían sido cultivados bajo las mismas condiciones. Al comienzo del experimento (día 0), los valores medios ( $\pm$ DE) del peso y la longitud corporal total de estos peces fueron  $18.98 \pm 1.20$  g y  $11.80 \pm 0.50$  cm, respectivamente. A los 27 días del experimento, los valores de longitud corporal fueron similares en los grupos C y V ( $P > 0.05$ ), mientras que los valores de peso corporal fueron significativamente más

calculated for each data group. Data distribution for each sampling day was analyzed by the Shapiro–Wilk test for  $P < 0.05$ . Data for size of fibers did not show a normal distribution ( $P < 0.05$ ) and Levene's test did not show homogeneous variances ( $P < 0.05$ ) either. Therefore, nonparametric tests were used (Mann–Whitney and Kolmogorov–Smirnov tests) to evaluate the effect of the diet on the size of the fibers ( $P < 0.05$ ). For most of the other parameters, both the Shapiro–Wilk test and Levene's test showed values of  $P > 0.05$  and the analysis of variance was therefore used; however, nonparametric tests were used in cases where  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Body growth and organosomatic indices

Before the start of the experiment, all specimens had been reared under the same culture conditions. At the beginning of the experiment (day 0), the mean weight and mean total body length values ( $\pm$ SD) for these specimens were  $18.98 \text{ g} \pm 1.20$  and  $11.80 \text{ cm} \pm 0.50$ , respectively. On day 27, fish body lengths were similar in groups C and V ( $P > 0.05$ ), whereas body weights were significantly lower in V than in C (Table 3). On day 62 of the experiment (fish 9 months old), results were similar to those found on day 27. Therefore, fish body lengths were similar in both groups ( $P > 0.05$ ). Likewise, FCR and SGR values were similar in both groups ( $P > 0.05$ ), but DIR values were significantly lower in V than in C (Table 3).

The HSI, VSI, and ILI values were similar in both groups, with no significant differences ( $P > 0.05$ ) (Table 3). Percent survival was  $97.3 (\pm 2)$  and  $99.3 (\pm 0.7)$  for C and V, respectively ( $P > 0.05$ ). Occasional deaths did occur during handling independent of the diets.

### Muscle growth

The muscle cross section from a 7-month-old specimen, at the beginning of the experiment (day 0), showed the typical morphological mosaic of postlarval and adult specimens, with the small fibers interposed with the big fibers (Fig. 1). On day 27 of the experiment, values for the transverse area of the white muscle were lower in group V than in group C ( $P < 0.05$ ) (Table 4). Regarding muscle cellularity, muscle hypertrophy was highest in group C ( $P < 0.05$ ) (Table 4; Fig. 1b, c). In contrast, the number of white fibers and muscle fiber density were higher in V than in C, and the difference was significant for muscle fiber density ( $P < 0.05$ ). On day 62 of the experiment, the mean value for the transverse area of the white muscle was lower in V than in C, but it was not statistically significant ( $P > 0.05$ ) (Table 4; Fig. 1d, e). Regarding muscle cellularity, hypertrophy was significantly higher in V than in C; however, hyperplasia and muscle fiber density were higher in C and the difference was significant for muscle fiber density ( $P < 0.05$ ).

bajos en V que en C (Tabla 3). A los 62 días del experimento (peces de 9 meses de edad), los resultados fueron similares a los encontrados en el día 27. Por lo tanto, los valores de longitud corporal fueron similares en ambos grupos ( $P > 0.05$ ). De igual manera, los valores de TCA y TCE fueron similares en ambos grupos ( $P > 0.05$ ), pero los valores de TID fueron significativamente más bajos en V que en C (Tabla 3).

Los valores de IHS, IDS e ILI fueron similares en ambos grupos, sin mostrar diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ) (Tabla 3). Los porcentajes de supervivencia fueron  $97.3 (\pm 2)$  y  $99.3 (\pm 0.7)$  para C y V, respectivamente ( $P > 0.05$ ). Sólo hubo muertes ocasionales durante el manejo, independientemente de la dieta.

### Crecimiento muscular

La sección transversa del músculo de un ejemplar de 7 meses de edad, al comienzo del experimento (día 0), mostró el mosaico morfológico típico de ejemplares postlarvarios y adultos, con pequeñas fibras interpuestas entre fibras grandes (Fig. 1). A los 27 días del experimento, los valores del área transversa del músculo blanco fueron más bajos en el grupo V que en el C ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4). Con relación a la celularidad muscular, los valores más altos de hipertrofia muscular se alcanzaron en el grupo C ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4; Fig. 1b, c). Por el contrario, el número de fibras blancas y la densidad de las fibras musculares fueron más altas en el grupo V que en el grupo C y la diferencia fue significativa para la densidad de las fibras ( $P < 0.05$ ). A los 62 días del experimento, el valor medio del área transversa del músculo blanco fue menor en el grupo V que en el grupo C, pero no fue estadísticamente significativo ( $P > 0.05$ ) (Tabla 4; Fig. 1d, e). Con relación a la celularidad muscular, la hipertrofia fue significativamente mayor en el grupo V que en el grupo C; sin embargo, la hiperplasia y la densidad de las fibras musculares fueron más altas en C y la diferencia fue significativa para la densidad de las fibras ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

### Crecimiento corporal, tasa de conversión alimenticia, tasa de crecimiento específico, tasa de ingesta diaria y supervivencia

El peso corporal final de los peces fue mayor en el grupo C, lo cual fue paralelo a una TID mayor, en comparación con el grupo V. Sin embargo, los valores de TCE y de TCA fueron similares en ambos grupos experimentales. Generalmente, la TCA en esta especie es de 1.28–1.44 durante el periodo de pre-engorda (Mylonas et al. 2009). Nuestros valores de TCA se encontraron dentro de este intervalo en los especímenes de 9 meses y fueron inclusive aún más bajos en los especímenes de 8 meses (Tabla 3), lo cual indica que ambos tipos de alimento son eficientes. Los porcentajes de proteína y grasa en ambos tipos de alimento son adecuados para esta especie

**Table 3.** Morphometric values and parameter estimates (mean  $\pm$  SD) for the control (C) and vegetal (V) groups on different days of the experiment, when fish were 8 and 9 months old. L, body length (cm); W, body weight (g); CF, condition factor; FCR, feed conversion rates; SGR, specific growth rate (% per day); DIR, daily intake rate (% per day); HSI, hepatosomatic index (%); VSI, viscerosomatic index (%); ILI, intestinal length index (%).

**Table 3.** Valores morfológicos y estimaciones de los parámetros (media  $\pm$  DE) para los grupos control (C) y vegetal (V) en diferentes días del experimento, cuando los peces tenían 8 y 9 meses de edad. L, longitud corporal (cm); W, peso corporal (g); CF, factor de condición; FCR, tasa de conversión de alimento; SGR, tasa de crecimiento específico (% por día); DIR, tasa de ingesta diaria (% por día); HSI, índice hepatosomático (%); VSI, índice digestosomático (%); ILI, índice de longitud intestinal (%).

Age	Group	L	W	CF	FCR	SGR	DIR	HSI	VSI	ILI
8 months (day 27)	C	12.81 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	25.76 $\pm$ 2.21 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>			
	V	12.74 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	24.50 $\pm$ 2.83 <sup>b</sup>	1.18 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>			
9 months (day 62)	C	14.54 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	34.78 $\pm$ 3.89 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.37 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	1.42 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	3.34 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	58.10 $\pm$ 7.70 <sup>a</sup>
	V	14.35 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	33.05 $\pm$ 3.80 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.31 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	1.49 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	3.40 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	54.88 $\pm$ 9.80 <sup>a</sup>

Different superscripts in each column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups C and V for each age.

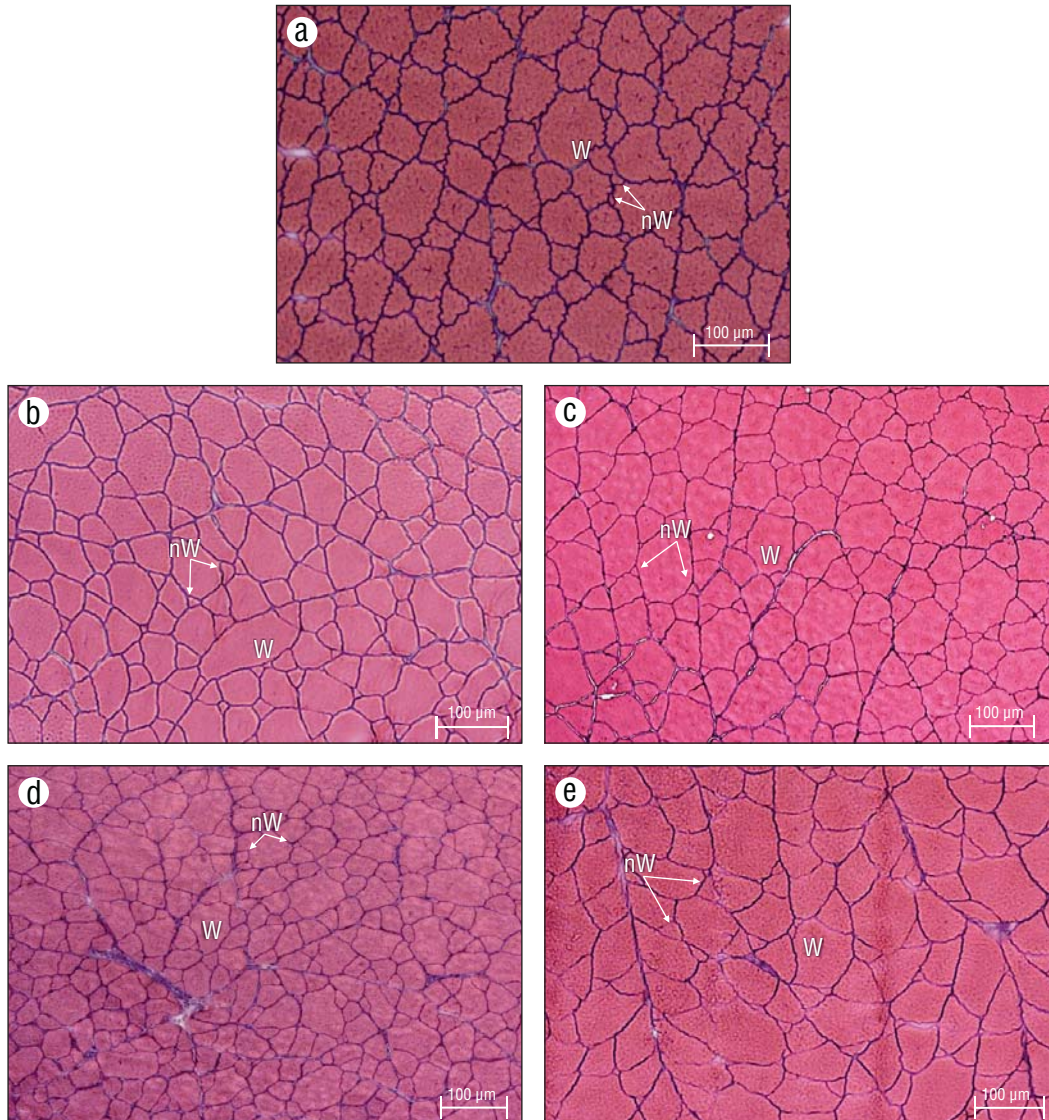
**Table 4.** Muscle parameters (mean values  $\pm$  SD). C, control group; V, vegetal group; B, cross-sectional area of the white muscle (mm<sup>2</sup>); A, area of white muscle fibers (μm<sup>2</sup>); D, minor axis length (μm); N, number of white fibers. Density is given as number of fibers per squared millimeter.

**Table 4.** Parámetros musculares (valores medios  $\pm$  DE). C, grupo control; V, grupo vegetal; B, área de la sección transversa del músculo blanco (mm<sup>2</sup>); A, área de las fibras musculares blancas (μm<sup>2</sup>); D, longitud del eje menor de las fibras blancas (μm); N, número de fibras blancas. La densidad está dada en número de fibras por milímetro cuadrado.

Age	Group	B	A	D	N	Density
7 months (day 0)		143.8 $\pm$ 13.80	1,637.20 $\pm$ 477.90	33.20 $\pm$ 6.50	92,406 $\pm$ 26,200	651.20 $\pm$ 168.01
8 months (day 27)	C	186.5 $\pm$ 31.60 <sup>a</sup>	2,015.99 $\pm$ 328.20 <sup>a</sup>	39.36 $\pm$ 3.64 <sup>a</sup>	92,053.47 $\pm$ 21,269.70 <sup>a</sup>	508.10 $\pm$ 82.65 <sup>a</sup>
	V	162.6 $\pm$ 18.62 <sup>b</sup>	1,743.56 $\pm$ 208.10 <sup>b</sup>	35.75 $\pm$ 2.43 <sup>b</sup>	98,078.78 $\pm$ 12,734.70 <sup>a</sup>	583.29 $\pm$ 73.70 <sup>b</sup>
9 months (day 62)	C	220.1 $\pm$ 26.02 <sup>a</sup>	2,212.93 $\pm$ 325.05 <sup>a</sup>	40.46 $\pm$ 2.66 <sup>a</sup>	92,975.07 $\pm$ 26,212.10 <sup>a</sup>	460.96 $\pm$ 69.80 <sup>a</sup>
	V	210.85 $\pm$ 23.90 <sup>a</sup>	2,635.70 $\pm$ 282.30 <sup>b</sup>	44.3 $\pm$ 2.87 <sup>b</sup>	80,549.12 $\pm$ 13,240.70 <sup>a</sup>	383.80 $\pm$ 45.28 <sup>b</sup>

Different superscripts in each column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups C and V for each age.





**Figure 1.** Cross sections of white muscles from 7- (a), 8- (b, c), and 9- (d, e) month-old *Umbrina cirrosa* specimens. Muscle sections in (b) and (d) correspond to specimens from the control group. Sections in (c) and (e) correspond to specimens from the vegetal group. Hematoxylin and eosin staining. W, white muscle fibers; nW, new white muscle fibers.

**Figura 1.** Secciones transversales de músculo blanco de ejemplares de *Umbrina cirrosa* de 7 (a), 8 (b, c) y 9 (d, e) meses de edad. Las secciones musculares en (b) y (d) corresponden a peces del grupo de control. Las secciones en (c) y (e) corresponden a peces del grupo vegetal. Tinción con hematoxilina y eosina. W, fibras musculares blancas; nW, nuevas fibras musculares blancas.

## DISCUSSION

### Growth, feed conversion rate, specific growth rate, daily intake rate, and survival

The final body weight of fish was higher in group C, which was parallel to the higher DIR, in comparison with group V. However, SGR and FCR were similar in both experimental groups. FCR for this species is generally 1.28–1.44 during the pre-fattening period (Mylonas et al. 2009). Our FCR values fell within this range for the

de acuerdo con Segato et al. (2005), y esto puede ser reforzado, en parte, por los datos obtenidos en el presente estudio. Además, estos resultados parecen indicar que la composición (perfil de amino ácidos, ácidos grasos, etc.) de ambos alimentos proporciona los nutrientes esenciales para esta especie.

Segato et al. (2005, 2008) alimentaron a 2 grupos de juveniles de verrugato con 2 dietas diferentes, la primera con un alto contenido de harina de pescado (47.5%) y de aceite de pescado (16.5%) y la segunda con una menor cantidad de harina de pescado (41.0–43.0%) y de aceite de pescado



9-month-old specimens and were even slightly lower for the 8-month-old specimens (Table 3), indicating both types of feed were efficient. The percentages of protein and fat in both types of feed are suitable for this species according to Segato et al. (2005), and this may be reinforced, in part, by the data obtained in the present study. Also, our results seem to indicate that the composition of both feeds (amino acid profile, fatty acids, etc.) provides the essential nutrients for this species.

Segato et al. (2005, 2008) fed 2 groups of juvenile shi drum with 2 different diets, the first containing high contents of fish meal (47.5%) and fish oil (16.5%) and the second containing a lesser amount of fish meal (41.0–43.0%) and fish oil (13.0–14.0%) by including vegetable ingredients. These authors recorded similar values of body weight, SGR, FCR, and DIR for fish fed both diets. The protein and fish oil levels used in our experiment were lower than those used by Segato et al. (2005, 2008). The low acceptance of the vegetal diet in our experiment seems to indicate an excessively high level of vegetable ingredients. For the meagre (*Argyrosomus regius*), a sciaenid of similar characteristics to the shi drum, Ribeiro et al. (2015) studied the effect of the replacement of 50% fish meal and up to 100% fish oil with plant-based ingredients on the growth of juvenile specimens over a course of 88 d and found that growth and feed efficiency were comparable in all diets. For juvenile gilthead sea bream, Benedito-Palos et al. (2016) studied the effect of diets with low fish meal and fish oil contents in juveniles over a course of 8 months; the control diet (D1) contained 23% fish meal and the experimental diets (D2, D3) contained only 3% fish meal. These authors found that fish oil in the D1 diet was 15.60%, which was reduced to 6.56% in D2 and 2.5% in D3. The D1 and D2 groups studied by Benedito-Palos et al. (2016) did not show differences in growth or food efficiency during almost the entire experimental period but group D3 showed lower dietary efficiency and less growth during the first 4 weeks of the trial, which was later partially compensated and resulted in a final weight being only 6–7% lower in D3 than in the control. According to Benedito-Palos et al. (2016), a very high level of fish meal and fish oil replacement is possible provided that the theoretical requirements for essential nutrients are met; however, the most extreme replacement levels (D3, 3% fish meal and 2.5% fish oil) would require an adaptive period to avoid initial and transient detrimental effects on growth performance. The D3 diet used by Benedito-Palos et al. (2016) was also tested in our study (the diet for group V), and the lower final weight values for fish in group V may indicate that fish require more time to get fully adapted. However, this issue remains to be studied. Results similar to those found by Benedito-Palos et al. (2016) were also found for gilthead sea bream juveniles by Simó-Mirabet et al. (2018) and Perera et al. (2019). Mortality in our study was not affected by dietary treatments, which is consistent with the findings of other authors (e.g., Segato et al. 2005).

(13.0–14.0%) al contener ingredientes vegetales. Estos autores registraron valores similares de peso corporal, TCE, TCA y TID para los peces alimentados con ambas dietas. Los niveles de proteína y aceite de pescado utilizados en nuestro experimento fueron más bajos que los utilizados por Segato et al. (2005, 2008). Por lo tanto, la baja aceptación de la dieta vegetal en nuestro experimento parece indicar un nivel excesivamente alto de ingredientes de origen vegetal. Para la corvina (*A. regius*), un esciéndido de características similares al verrugato, Ribeiro et al. (2015) estudiaron el efecto de reemplazar el 50% de la harina de pescado y hasta el 100% del aceite de pescado por ingredientes de origen vegetal durante 88 d en el crecimiento de juveniles y encontraron que el crecimiento y la eficiencia del alimento fueron similares con todas las dietas. Para juveniles de dorada, Benedito-Palos et al. (2016) estudiaron el efecto de dietas con bajo contenido de harina y aceite de pescado durante 8 meses; la dieta control (D1) contenía 23% de harina de pescado y las dietas experimentales (D2, D3) contenían solo un 3% de harina de pescado. Estos autores encontraron que el aceite de pescado en la dieta D1 fue del 15.6%, el cual fue reducido a 6.56% en D2 y a 2.5% en D3. Los grupos D1 y D2 estudiados por Benedito-Palos et al. (2016) no mostraron diferencias en el crecimiento o en la eficiencia alimentaria durante casi todo el periodo experimental, pero el grupo D3 mostró una eficiencia alimenticia más baja y menor crecimiento durante las primeras 4 semanas de la prueba, lo que se revirtió parcialmente más tarde, de modo que el peso final en D3 fue solo un 6–7% menor que en el control. Según Benedito-Palos et al. (2016), el reemplazo de un nivel muy alto de harina y aceite de pescado es factible cuando la dieta proporciona los requisitos teóricos de nutrientes esenciales; sin embargo, con una dieta extrema (D3, 3% de harina de pescado y 2.5% de aceite de pescado), puede ser necesario un periodo de adaptación para evitar efectos perjudiciales iniciales y transitorios en el rendimiento del crecimiento. La dieta D3 utilizada por Benedito-Palos et al. (2016) es la misma dieta que fue probada en el presente estudio (la dieta para el grupo V), y el menor peso final de los peces en el grupo V puede indicar que los peces requieren un periodo de adaptación más amplio. Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios para verificar esta hipótesis. Resultados similares a los encontrados por Benedito-Palos et al. (2016) fueron encontrados en juveniles de dorada por Simó-Mirabet et al. (2018) y Perera et al. (2019). La mortalidad en nuestro estudio no se vio afectada por el régimen alimenticio, lo cual concuerda con lo encontrado por otros autores (e.g., Segato et al. 2005).

### **Influencia de la dieta en los índices organosomáticos**

En nuestro experimento, los índices organosomáticos fueron similares en ambos grupos, lo que indica una buena adaptación del sistema digestivo y el hígado a la absorción y el metabolismo de los vegetales. Del mismo modo, en el estudio de Segato et al. (2005), el IHS no cambió significativamente

### Diet influence on organosomatic indices

In our experiment, organosomatic indices were similar in both groups, which indicates good adaptation of the digestive system and liver to the absorption and metabolism of vegetables. Similarly, in the study by Segato et al. (2005), HSI did not change significantly among groups fed different diets; however, the vegetal diet produced an increase in VSI, probably due to the larger intestines. The fact that the vegetable percentages in the diets used by Segato et al. (2005) are different from those employed in our diets may explain the differences in the results between both studies. Benedito-Palos et al. (2016) also showed that dietary treatments did not have significant effects on organosomatic indices, although they reported the highest HSI value for fish in group D3, for which ILI was also slightly higher with respect to fish from the other groups. Perera et al. (2019) also discovered that the intestine was enlarged in fish fed a vegetal diet and they assumed this to be an effective adaptation mechanism to preserve maximum growth.

### Influence of the diet on muscle growth and muscle cellularity

Growth in fish involves muscle fiber recruitment and hypertrophy. The number of muscle fibers recruited to reach a particular girth varies between families and strains and is influenced by environmental factors including diet, exercise, light, and temperature regimes (Johnston 1999, Ayala et al. 2003, López-Albors et al. 2003, Johnston et al. 2011). In the present study, the transverse area of the white muscle and white fiber hypertrophy were higher in group C than in group V after 27 days. Similar results have been previously found for *S. senegalensis* by Valente et al. (2016), who used diets with increasing percentages of dietary plant ingredients (50%, 75%, and 100%). In the study by Valente et al. (2016), fish fed diets with 50% and 75% vegetable proteins did not show differences in body or muscle growth, but fish on 100% vegetal protein showed significantly less body growth (length) and a lower transverse area of the white muscle and its fibrillar size, as well as showing lower fillet firmness; however, the number of fibers (hyperplasia) was similar in all groups. In contrast, our results showed significant differences in hyperplasia and muscle fiber densities, such that both muscle parameters were higher in group V than in group C on day 27. At the end of our experiment, muscle cellularity showed an opposite trend to that observed for day 27. These results suggest that the vegetal diet influenced the relative contribution of hypertrophy and hyperplasia to myotome growth in shi drum and that hypertrophy was the most significantly influenced parameter.

Muscle cellularity influences flesh characteristics, particularly texture, such that muscle fiber density positively correlates with flesh firmness, as has been observed for the shi drum (Ayala et al. 2015) and other fish species (Hatae et al.

entre grupos con diferentes dietas; sin embargo, la dieta para el grupo V produjo un aumento del IDS, probablemente debido a un mayor desarrollo intestinal. Los porcentajes de vegetales en las dietas utilizadas por Segato et al. (2005) son diferentes a los empleados en nuestras dietas, lo cual puede explicar las diferencias en los resultados entre ambos estudios. Benedito-Palos et al. (2016) también mostraron que el régimen alimenticio no tuvo efectos significativos en los índices organosomáticos, aunque el IHS más alto lo encontraron en los peces del grupo D3, para los cuales el ILI también fue ligeramente mayor con respecto a los peces de los otros grupos. Perera et al. (2019) también descubrieron que el intestino estaba alargado en los peces que habían sido alimentados con una dieta vegetal, y esto lo interpretaron como un mecanismo de adaptación efectivo para garantizar el máximo crecimiento.

### Influencia de la dieta sobre el crecimiento muscular y la celularidad muscular

El crecimiento en peces implica el reclutamiento y la hipertrofia de las fibras musculares. El número de fibras musculares generadas para alcanzar un tamaño determinado varía entre las diferentes familias y estirpes familiares de las especies y está influenciado por factores ambientales como la dieta, el ejercicio, la luz y los regímenes de temperatura (Johnston 1999, Ayala et al. 2003, López-Albors et al. 2003, Johnston et al. 2011). En el presente estudio, el área transversa del músculo blanco y la hipertrofia de las fibras blancas fueron más altas en el grupo C que en el grupo V después de 27 días. Resultados similares han sido encontrados previamente en *S. senegalensis* por Valente et al. (2016), quienes utilizaron dietas con porcentajes crecientes de ingredientes vegetales en las dietas (50%, 75% y 100%). En el estudio de Valente et al. (2016) los peces que habían sido alimentados con 50% y 75% de proteínas vegetales en las dietas no mostraron diferencias en el crecimiento corporal o muscular, pero los peces alimentados con 100% de proteína vegetal en la dieta mostraron un crecimiento corporal (longitud) significativamente menor que el resto de los grupos y menor área transversa del músculo blanco y su tamaño fibrilar, así como una menor firmeza del filete; sin embargo, el número de fibras (hiperplasia) fue similar en todos los grupos. Por el contrario, nuestros resultados mostraron diferencias significativas en la hiperplasia y la densidad de las fibras musculares, de modo que ambos parámetros musculares fueron más altos en el grupo V que en el C en el día 27. Al final de nuestro experimento, la celularidad muscular mostró una tendencia opuesta a lo observado en el día 27. Estos resultados muestran que la dieta vegetal influyó en la contribución relativa de la hipertrofia y la hiperplasia al crecimiento del miotomo del verrugato y que la hipertrofia fue el parámetro más influido significativamente.

La celularidad muscular influye en las características de la carne, en particular en la textura, de tal forma que la densidad

1984, 1990; Periago et al. 2005). Hence, the resulting variation in muscle cellularity in groups V and C can lead to differences in fillet texture at harvest size. Long-term studies would be necessary to verify this hypothesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was a collaboration between the Instituto Español de Oceanografía and the Universidad de Murcia. We appreciate the collaboration of the Institute of Aquaculture Torre de la Sal, Spanish National Research Council, for providing the vegetal-based diet used in this experiment. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Akpinar Z, Sevgili H, Demir A, Özgen T, Emre Y, Tufan-Eroldoğan O. 2012. Effects of dietary lipid levels on growth, nutrient utilization, and nitrogen and carbon balances in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture Int.* 20(1):131–143. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9447-7>
- Arizcun-Arizcun M, García-Alcázar A, Abellán-Martínez E. 2014. Completion of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) life cycle [abstract]. In: AE14 Summary Report. Aquaculture Europe 2014; 2014 Oct 14–17; San Sebastián, Spain. [Place unknown]: European Aquaculture Society. p. 78–79.
- Ayala MD, Abellán E, Arizcun M, García-Alcázar A, Navarro F, Blanco A, López-Albors OM. 2013. Muscle development and body growth in larvae and early post-larvae of shi drum, *Umbrina cirrosa* L., reared under different larval photoperiod: muscle structural and ultrastructural study. *Fish Physiol Biochem.* 39(4):807–827. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9742-x>
- Ayala MD, López-Albors O, García-Alcázar A, Abellán E, Latorre R, Vázquez JM, Ramírez-Zarzosa G, Martínez F, Gil F. 2003. Effect of two thermal regimes on the muscle growth dynamics of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax* L. *Anat Histol Embryol.* 32(5):271–275. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2003.00482.x>
- Ayala MD, Arizcun M, García-Alcázar A, Santaella M, Abellán E. 2015. Long-term effects of the larval photoperiod on the subsequent growth of shi drum *Umbrina cirrosa* L. specimens and the fillet texture at commercial size. *Turk J Fish Aquat Sci.* 15:93–101. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15\\_1\\_10](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_1_10)
- Benedito-Palos L, Ballester-Lozano GF, Simó P, Karalazos V, Ortiz Á, Caldach-Giner J, Pérez-Sánchez J. 2016. Lasting effects of butyrate and low FM/FO diets on growth performance, blood haematology/biochemistry and molecular growth-related markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture.* 454:8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.008>
- Hatae K, Yoshimatsu F, Matsumoto JJ. 1984. Discriminative characterization of different texture profiles of various cooked fish muscles. *J Food Sci.* 49(3):721–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13195.x>
- Hatae K, Yoshimatsu F, Matsumoto JJ. 1990. Role of muscle fibers in contributing firmness of cooked fish. *J Food Sci.* 55(3):693–696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb05208.x>
- de las fibras musculares se correlaciona positivamente con la firmeza de la carne, como se ha observado en esta especie (Ayala et al. 2015) y otras especies de peces (Hatae et al. 1984, 1990; Periago et al. 2005). Por lo tanto, la variación resultante en la celularidad muscular en los grupos V y C puede dar lugar a diferencias en la textura del filete al tamaño comercial. Sin embargo, se necesitarían estudios a largo plazo para verificar esta hipótesis.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo mediante la colaboración entre el Instituto Español de Oceanografía y la Universidad de Murcia. Agradecemos la colaboración del Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España), que proporcionó el pienso vegetal utilizado en este experimento. Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de organismos de financiación en los sectores público, comercial o sin ánimo de lucro. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Izquierdo MS. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition.* 2(4):183–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.1996.tb00058.x>

Izquierdo MS, Montero D, Robaina L, Caballero MJ, Rosenlund G, Ginés R. 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture.* 250(1–2):431–444. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.001>

Johnsen CA, Hagen Ø, Bendiksen EÅ. 2011. Long-term effects of high-energy, low fishmeal feeds on growth and flesh characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture.* 312(1–4):109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.012>

Johnston IA. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture.* 177(1–4):99–115. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00072-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00072-1)

Johnston IA, Bower NI, Macqueen DJ. 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J Exp Biol.* 214:1617–1628. <https://doi.org/10.1242/jeb.038620>

Kaushik SJ, Covès D, Dutto G, Blanc D. 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture.* 230(1–4):391–404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)

López-Albors O, Ayala MD, Gil F, García-Alcázar A, Abellán E, Latorre R, Ramírez-Zarzosa G, Vázquez JM. 2003. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juvenile stages. *Aquaculture.* 220(1–4):385–406. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00532-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00532-X)

Morgane H, Fountoulaki E. 2014. Optimal dietary protein/lipid ratio for improved immune status of a newly cultivated Mediterranean fish species, the shi drum *Umbrina cirrosa*, L. *Fish Shellfish Immunol.* 37(2):215–219. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.005>



- Mylonas C, Georgiu G, Stephanou D, Atack T, Afonso A, Zohar Y. 2004. Preliminary data on the reproductive biology and hatchery production of the shi drum (*Umbrina cirrosa*) in Cyprus. *CIHEAM Options Méditerranéennes*. 47:303–312.
- Mylonas CC, Pavlidis M, Papandroulakis N, Zaiss MM, Tsafarakis D, Papadakis IE, Varsamos S. 2009. Growth performance and osmoregulation in the shi drum (*Umbrina cirrosa*) adapted to different environmental salinities. *Aquaculture*. 287(1–2):203–210. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.024>
- Perera E, Simó-Mirabet P, Shin HS, Rosell-Moll E, Naya-Catalá F, de las Heras V, Martos-Sitcha JA, Karalazos V, Armero E, Arizcun M, et al. 2019. Selection for growth is associated in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with diet flexibility, changes in growth patterns and higher intestine plasticity. *Aquaculture*. 507:349–360. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.052>
- Periago MJ, Ayala MD, López-Albors O, Abdel I, Martínez C, García-Alcázar A, Ros G, Gil F. 2005. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*. 249(1–4):175–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.047>
- Pratoomyot J, Bendiksen EÅ, Bell JG, Tocher DR. 2010. Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 305(1–4):124–132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.019>
- Ribeiro L, Moura J, Santos M, Colen R, Rodrigues V, Bandarra N, Soares F, Ramalho P, Barata M, Moura P, et al. 2015. Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*. 447(1):116–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.017>
- Segato S, Corato A, Fasolato L, Andrighetto I. 2005. Effect of the partial replacement of fish meal and oil by vegetable products on performance and quality traits of juvenile shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Ital J Anim Sci*. 4(2):159–166. <http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2005.159>
- Segato S, Fasolato L, Balzan S, Elia CA, Novelli E, Andrighetto I. 2008. Effect of dietary EE/NFE ratio on sensorial traits of juvenile shi drum. *Acta Agriculturae Slov*. 2:123–127
- Sevgili H, Akpınar Z, Emre Y. 2015. Juvenile shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) responds differently to selected commercial fish meals. *Turk J Fish Aquat Sc*. 15:29–38. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15\\_1\\_04](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_1_04)
- Sijtsma L, de Swaaf ME. 2004. Biotechnological production and applications of the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexanoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64:146–153. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1525-y>
- Simó-Mirabet P, Perera E, Caldach-Giner JA, Afonso JM, Pérez-Sánchez J. 2018. Co-expression Analysis of sirtuins and related metabolic biomarkers in juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with differences in growth performance. *Front Physiol*. 9:608. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00608>
- Valente LMP, Cabral EM, Sousa V, Cunha LM, Fernandes JMO. 2016. Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. *Aquaculture*. 453:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.034>

Received January 2020,  
accepted April 2020.