

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA



INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA
SOBRE EL CRECIMIENTO MUSCULAR DE LA
LUBINA, *Dicentrarchus labrax* L., DURANTE EL
DESARROLLO LARVARIO.

Memoria presentada por Dña. M^a Dolores AYALA FLORENCIANO
para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

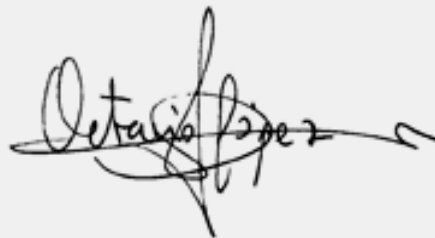
Murcia, Octubre de 1999

OCTAVIO LÓPEZ ALBORS, PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.

INFORMA:

Que Dña. M^a Dolores AYALA FLORENCIANO, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo sobre **“Influencia de la temperatura sobre el crecimiento muscular de la lubina, *Dicentrarchus labrax* L., durante el desarrollo larvario”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica deseadas para su defensa por parte de la interesada, con vistas a optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmo autorizando su presentación.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Octavio López', with a stylized flourish at the end.

Murcia, Octubre de 1999

FRANCISCO GIL CANO, PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.

INFORMA:

Que Dña. M^a Dolores AYALA FLORENCIANO, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo sobre **“Influencia de la temperatura sobre el crecimiento muscular de la lubina, *Dicentrarchus labrax* L., durante el desarrollo larvario”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científicas deseadas para su presentación por el interesado, con vistas a optar al título de doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmo autorizando su presentación.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco Gil Cano', enclosed within a large, loopy circular flourish.

Murcia, Octubre de 1999

D. ANTONIO BERNABÉ SALAZAR, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

INFORMA:

Que en Junta de Departamento (por delegación del Consejo) se acordó por unanimidad la tramitación de la Tesis Doctoral titulada “**Influencia de la temperatura sobre el crecimiento muscular de la lubina, *Dicentrarchus labrax* L., durante el desarrollo larvario**”, presentada por la licenciada en Veterinaria Dña. M^a Dolores Ayala Florenciano.

Lo que se hace constar a efectos oportunos, en Murcia 29 octubre de 1999



ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO DEL GRUPO ÁREAS DE CIENCIAS DE LA SALUD.

*“El final de toda exploración será llegar al punto de partida
y conocer el lugar por primera vez”*

Thomas S. Eliot

A mis padres,
amor de tantos días...

AGRADECIMIENTOS:

A los Drs. D. Octavio M. López Albors y D. Francisco Gil Cano, directores de este trabajo, a quienes expreso mi gratitud por todo lo que me han aportado a nivel profesional y personal, y la constante e inestimable ayuda que me han prestado. Quiero agradecer también la confianza que me demostraron, porque ello me impulsó a esforzarme por merecerla.

A los Drs. D. Francisco Moreno Medina y D. José María Vázquez Autón, por permitirme compartir con ellos su lugar de trabajo y su experiencia, contribuyendo así a enriquecer mi formación.

A los Drs. D. Gregorio Ramírez Zarzorsa y D. Rafael Latorre Reviriego, por el apoyo que me prestaron en todo momento, y sobre todo, por el agrado y respeto con que siempre lo hicieron.

Al personal del Centro Oceanográfico de Murcia, en especial a las Dras. Alicia García Alcázar y Emilia Abellán Martínez, porque su esfuerzo y colaboración han estado siempre presentes.

Al Dr. D. Serafín Gómez Cabrera, que me ayudó en la nomenclatura de las especies, con entusiasmo y, a la vez, con gran espíritu crítico.

Al personal del servicio de Microscopía electrónica, particularmente a María García y Manoli Bernal, y a M^a Teresa Castell, del servicio de Estudio y Proceso Digital de Imágenes, por el excelente trabajo que realizan a diario.

A los compañeros Joaquín Gadea, por sus comentarios minuciosos en los temas de estadística, que contribuyeron a mejorar este apartado del trabajo, y a Carlos de Jódar, por su siempre oportuna y eficaz ayuda en el perfeccionamiento de las imágenes y la configuración del texto.

Espero haber sabido aprovechar la suerte de contar con todos ellos, y con el gran número de personas, cuyas aportaciones hacen posible un trabajo como éste.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	9
-----------------------------	----------

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	16
----------------------------------------	-----------

II-1. ESTRUCTURA DE LA MUSCULATURA AXIAL DE LOS TELEÓSTEOS.....	17
II-1.1. TIPOS DE FIBRAS DE LA MUSCULATURA AXIAL DE LOS PECES TELEÓSTEOS.....	18

II-2. GÉNESIS Y MECANISMOS DE CRECIMIENTO MUSCULAR DURANTE EL DESARROLLO DE LOS TELEÓSTEOS.....	26
II-2.1. DESARROLLO MUSCULAR EN EL EMBRIÓN: MIOGÉNESIS.....	27
II-2.2. DESARROLLO Y CRECIMIENTO MUSCULAR DURANTE EL PERÍODO LARVARIO.....	32
II-2.3. DINÁMICA DE CRECIMIENTO MUSCULAR EN FASE POSTLARVARIA.....	44
II-2.4. DINÁMICA DE CRECIMIENTO MUSCULAR EN JUVENILES Y ADULTOS.....	47

II-3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO Y EL CRECIMIENTO MUSCULAR.....	48
II-3.1. INFLUENCIA SOBRE LA ORGANOGÉNESIS (MIOGÉNESIS).....	48
II-3.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MUSCULATURA DE LA LARVA.....	51
II-3.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MUSCULATURA Y COMPOSICIÓN CORPORAL EN POSTLARVAS.....	61
II-3.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MUSCULATURA EN ESPECIES ADULTAS.....	63

II-4. EFECTO DE LA INTERACCIÓN TEMPERATURA-ALIMENTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO LARVARIOS.....	64
II-4.1. PERÍODO DE ALIMENTACIÓN ENDÓGENA.....	64
II-4.2. TRANSICIÓN DESDE LA ALIMENTACIÓN ENDÓGENA A LA EXTERNA (PERÍODO MIXTO DE ALIMENTACIÓN).....	70
II-4.3. PERÍODO DE ALIMENTACIÓN EXÓGENA.....	71

II-5. ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ACUÍCOLAS DE <i>Dicentrarchus labrax</i>	73
II-5.1. INTERÉS ACUÍCOLA DE <i>Dicentrarchus labrax</i>	74
II-5.2. ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL DESARROLLO LARVARIO DE <i>Dicentrarchus labrax</i>	74
II-5.3. FASE POSTLARVARIA.....	76

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III-1. ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES EMPLEADAS.....	79
III-1.1. EXPERIMENTO 1° (1996).....	80
III-1.2. EXPERIMENTO 2° (1997).....	81
III-1.3. EXPERIMENTO 3° (1998).....	84
III-2. TOMA DE MUESTRAS.....	85
III-3. PROCESADO.....	89
III-3.1. INCLUSIÓN EN EPON.....	89
III-3.2. SECCIONES.....	90
III-3.3. TINCIÓN: Técnica de Ontell (1974).....	90
III-4. FOTOGRAFIADO.....	92
III-5. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	92
III-5.1. PARÁMETROS.....	92
III-5.2. NÚMERO DE EJEMPLARES MEDIDOS.....	94
III-5.3. NÚMERO DE ESTRUCTURAS MEDIDAS EN CADA EJEMPLAR.....	94

III-6. ANÁLISIS DE DATOS.....	95
-------------------------------	----

IV. RESULTADOS

IV-1. ESTRUCTURA DE LA MUSCULATURA AXIAL.....	103
IV-2. CRECIMIENTO MUSCULAR Y DESARROLLO LARVARIOS: EXPERIMENTO 1° (1996).....	107
IV-2.1. CRECIMIENTO MUSCULAR.....	107
IV-2.2. TASAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO.....	113
IV-2.3. LONGITUDES Y PESOS. SUPERVIVENCIA.....	117
IV-3. CRECIMIENTO MUSCULAR Y DESARROLLO LARVARIOS DE <i>D. labrax</i> ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA: EXPERIMENTO 2° (1997).....	119
IV-3.1. CRECIMIENTO MUSCULAR DE <i>D. labrax</i> ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA.....	119
IV-3.2. PORCENTAJES DE MÚSCULO BLANCO Y ROJO RESPECTO AL TOTAL DEL MIOTOMO.....	144
IV-3.3. TASAS DE CRECIMIENTO MUSCULAR Y DESARROLLO.....	145
IV-3.4. TALLAS Y PESOS CORPORALES, DIÁMETROS DE LOS HUEVOS, LONGITUDES DEL SACO VITELINO Y SUPERVIVENCIAS.....	156
IV-4. CRECIMIENTO MUSCULAR EN <i>D. labrax</i> ATLÁNTICA: EXPERIMENTO 3° (1998)..	161
IV-5. COROLARIO.....	162
IV-5.1. COMPARACIÓN DE LAS POBLACIONES DE <i>D. labrax</i> DE 1996, 1997 y 1998 (EXPERIMENTOS 1°-3°). EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN.....	162
IV-5.2. TASA DE DESARROLLO DE <i>D. labrax</i> . TRATAMIENTO CONJUNTO DE LAS POBLACIONES DE 1996, 1997 Y 1998 (EXPERIMENTOS 1°-3°).....	166

V. DISCUSIÓN

V-1. DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE LA MUSCULATURA AXIAL.....	168
V-1.1. FASE VITELINA.....	168
V-1.2. DESDE EL COMIENZO DE LA ALIMENTACIÓN VIVA HASTA EL DESTETE.....	170
V-1.3. FINAL DEL DESARROLLO LARVARIO Y FASE POSTLARVARIA.....	171
V-2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO LARVARIO.....	172
V-3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO MUSCULAR.....	174
V-3.1. FASE VITELINA.....	174
V-3.2. DESDE EL COMIENZO DE LA ALIMENTACIÓN VIVA HASTA EL DESTETE.....	180
V-3.3. FINAL DEL DESARROLLO LARVARIO.....	183
V-3.4. FASE POSTLARVARIA.....	188
V-4. SUPERVIVENCIA LARVARIA. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	189

VI. RESUMEN.....	193
-------------------------	------------

VII. CONCLUSIONES.....	198
-------------------------------	------------

VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	202
--------------------------------	------------

IX. ANEXO: TABLA DE DATOS.....	223
---------------------------------------	------------

I.-INTRODUCCIÓN.

I.-INTRODUCCIÓN

El estudio de la musculatura lateral de los peces teleósteos es un campo de investigación que se inició a finales de los años sesenta, y que todavía hoy presenta numerosos aspectos de interés científico que necesitan ser estudiados con mayor profundidad.

Inicialmente los trabajos se enfocaron con un fin comparativo respecto a los mamíferos. En este sentido, destaca el hecho de que, a diferencia con estos últimos, en los teleósteos el crecimiento muscular por formación de nuevas fibras (hiperplasia), no queda restringido al período embrionario e inmediato a la eclosión, sino que se puede prolongar durante la fase postlarvaria o incluso en los adultos de la mayoría de especies (Stickland, 1983; Romanello *et al.*, 1987; Weatherley *et al.*, 1988; Higgins y Thorpe, 1990). Además, los miotomos de los embriones de los teleósteos no evolucionan en el mismo sentido que en los mamíferos, de forma que al final de la metamorfosis larvaria, la sección transversal de los miotomos presenta dos estratos musculares mayoritarios: un estrato superficial, integrado por fibras rojas de pequeño diámetro, con abundantes mitocondrias, de contracción lenta y fatigoresistentes (Nag, 1972; Johnston *et al.*, 1975; Mosse y Hudson, 1977; Carpene *et al.*, 1982; Tatarczuch y Kilarski, 1982; Sängner *et al.*, 1989; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; López-Albors *et al.*, 1998); y un estrato profundo de mayor

grosor, integrado por fibras blancas de mayor tamaño, con escasas mitocondrias y abundantes miofibrillas, de contracción rápida y fatigosensibles (Johnston y Moon, 1981; Scapolo *et al.*, 1988; Sanger *et al.*, 1990; López-Albors *et al.*, 1998; Ramerez-Zarzosa *et al.*, 1998). Además, entre ambos estratos, el empleo de técnicas histoquemicas permite definir un tercer músculo, denominado intermedio o rosa, cuyas fibras presentan una morfología y características histoenzimaticas intermedias a las de los músculos rojo y blanco (Johnston *et al.*, 1974; Patterson *et al.*, 1975; Carpene *et al.*, 1982; Mascarello *et al.*, 1986; Scapolo *et al.*, 1988).

Al interés comparativo de los estudios sobre la musculatura axial de los teleósteos hay que añadir el interés aplicativo de la investigación sobre la dinámica de crecimiento de la musculatura, ya que este tejido representa en los peces hasta un 60-70% de su peso y es el que le confiere su valor nutritivo y comercial. En este sentido, los estudios que tratan de evaluar el efecto de la temperatura sobre la dinámica de crecimiento de la musculatura de los teleósteos, además de contemplar unos objetivos descriptivos de investigación básica, siempre intentan extraer algunos aspectos aplicativos de interés acuícola.

Dado que los teleósteos son poiquiloterms, la temperatura ambiental del medio en el que viven determina en gran medida los parámetros biológicos de cada especie. Así, la temperatura ejerce un profundo efecto sobre el desarrollo de los peces (Blaxter y Hempel, 1963; Herzig y Winkler, 1986; Blaxter, 1988, citados por Kamler, 1992), describiéndose un rango óptimo para su desarrollo, e incrementándose la mortalidad y las anormalidades corporales a medida que la temperatura se aleja de ese rango (Polo *et al.*, 1991). En diferentes especies de teleósteos se ha demostrado que la temperatura influye en la secuencia de aparición de los caracteres externos y de los rganos (Fukuhara, 1990), en el estado de desarrollo al que tiene lugar la eclosión (Herzig y Winkler, 1986), en el número de verteras (Tanning, 1952) y también en las características estructurales y ultraestructurales de las fibras musculares (Stickland *et al.*, 1988; Vieira y Johnston, 1992).

El estudio del efecto de la temperatura sobre la musculatura axial de los teleósteos resulta particularmente interesante durante las fases embrionaria y larvaria. En estos períodos acontecen importantes hechos biológicos como la organogénesis o la metamorfosis, sobre los cuales la influencia de la temperatura ambiental puede tener importantes consecuencias para el posterior crecimiento y la propia supervivencia de las larvas y postlarvas (Johnston, 1993). Así, en el arenque, *Clupea harengus* L., los embriones sometidos a bajas temperaturas de incubación mostraron un retraso en la miogénesis, mientras que a mayores temperaturas todos los órganos y tejidos corporales se

desarrollaron más rápidamente (Johnston, 1993; Johnston *et al.*, 1995, 1997). Asimismo, en larvas de esta especie recién eclosionadas, las altas temperaturas de incubación aumentaron la hiperplasia del músculo blanco (Vieira y Johnston, 1992; Johnston *et al.*, 1995), mientras que en el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (L.) (Gibson y Johnston, 1995), salmón, *Salmo salar* (Stickland *et al.*, 1988; Usher *et al.*, 1994; Nathanailides *et al.*, 1995a) y en otro stock de *C. harengus* (Johnston, 1993) el aumento de temperatura incrementó la hipertrofia de las fibras del músculo blanco. En larvas recién eclosionadas de solla, *Pleuronectes platessa* L., Brooks y Johnston (1993) observaron que tanto la hipertrofia como la hiperplasia de las fibras blancas estaban incrementadas a altas temperaturas de incubación.

La temperatura afecta también al contenido estructural de las fibras musculares, y así, la aplicación de elevadas temperaturas aumentó la proporción de miofibrillas de las fibras del músculo blanco en larvas recién eclosionadas de *P. platessa* (Brooks y Johnston, 1993), *C. harengus* (Johnston, 1993) y *S. salar* (Stickland *et al.*, 1988; Usher *et al.*, 1994). La densidad de volumen mitocondrial, por su parte, se incrementó en las fibras rojas de las especies sometidas a mayores temperaturas (*P. platessa*, Brooks y Johnston, 1993; *C. harengus*, Vieira y Johnston, 1992; Johnston, 1993). De igual forma, la temperatura influye en el número y grado de diferenciación de los mioblastos a la eclosión (Johnston, 1993) y ejerce un profundo efecto sobre la fusión y crecimiento de las células miosatélites (Matschak y Stickland, 1995).

Como se puede apreciar, los distintos trabajos realizados para evaluar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo y el crecimiento de la musculatura axial de los teleósteos, muestran una considerable variabilidad inter- e intraespecífica, cuyo conocimiento es particularmente interesante cuando se contempla la posibilidad de una futura aplicación de estos experimentos al ámbito acuícola productivo. No obstante, la respuesta que presentan las diferentes especies ante la temperatura no siempre es fácil de interpretar, ya que intervienen diversos aspectos relacionados con el desarrollo, la alimentación, la filogenia de cada especie, etc.

La lubina, *Dicentrarchus labrax* L., es un teleósteo marino que se encuentra en los mares Mediterráneo y Atlántico. Es una especie muy euriterma, por lo que soporta grandes variaciones de temperatura (con un máximo de 30 °C, un mínimo de 5 °C y un óptimo de 22 °C). Su crecimiento es relativamente rápido y posee un alto valor en el mercado. Tanto el preengorde como el engorde de esta especie se realizan a nivel industrial con gran

rentabilidad, viéndose ésta aumentada a altas temperaturas, lo que ilustra la importancia de valorar la influencia de este parámetro durante la fase larvaria (Barnabé, 1991). Algunos estudios previos han caracterizado el desarrollo y crecimiento de la musculatura axial en esta especie (Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; López-Albors *et al.*, 1998). Su dinámica de crecimiento muscular se corresponde con la de las especies de rápido crecimiento y gran tamaño final, caracterizándose por un crecimiento hiperplásico hasta una longitud corporal aproximada de 48 cm. (Veggetti *et al.*, 1990).

El efecto de la temperatura sobre la dinámica de crecimiento de la musculatura de *D. labrax* mediterránea ha sido estudiado por Nathanailides *et al.* (1996) en ejemplares juveniles. Sin embargo, a pesar de que la valoración del efecto de la temperatura sobre la musculatura axial en embriones y larvas es particularmente interesante, tales estudios no se han realizado hasta ahora en *D. labrax*. Tal y como se propone a partir de los resultados hallados en otras especies (Johnston *et al.*, 1996, 1998), la experiencia térmica durante las fases más tempranas del desarrollo, podría en gran medida determinar las características del crecimiento postlarval de los teleósteos. Así, en *C. harengus*, durante las fases embrionaria y larvaria, la temperatura es capaz de modular la composición fibrilar de los miotomos (número y tamaño de los miocitos), lo cual puede ser determinante para el posterior crecimiento muscular.

En consonancia con estos estudios, en este trabajo de tesis doctoral investigamos la influencia de la temperatura en el crecimiento de la musculatura axial de *D. labrax*, durante las fases iniciales de su desarrollo. Para ello se han realizado una serie de experimentos donde se han sometido huevos y larvas de *D. labrax* a diferentes temperaturas de incubación y cultivo. De esta forma hemos valorado el efecto de la temperatura tanto en ejemplares en los que la temperatura no se manipuló externamente (experiencias a temperatura ambiental), como en ejemplares en los que se modificó la temperatura desde el momento de la fertilización y/o eclosión (experiencias de aclimatación).

Estos experimentos se han realizado en colaboración con el Centro Oceanográfico de Murcia (Planta de cultivos marinos de Mazarrón del Instituto Español de Oceanografía). Durante los años 1996 a 1998, en dicho Centro se realizó la obtención y selección de las puestas, la incubación y el cultivo de los peces. A continuación, exponemos los diferentes

experimentos realizados, junto con los objetivos e hipótesis de trabajo que nos planteamos en cada caso:

1996.- Estudio preliminar para valorar el efecto de la temperatura de incubación y cultivo sobre el crecimiento de *D. labrax*. Este objetivo general se sustenta en las siguientes hipótesis: i) el empleo de diferentes temperaturas de incubación y cultivo permite obtener distintos fenotipos corporales y musculares valorables por la longitud, el peso, el tamaño del miotomo, y el número y tamaño medio de sus fibras; ii) existe una combinación óptima de temperatura de incubación y cultivo para la obtención de dinámicas de crecimiento muscular más ventajosas, desde el punto de vista acuícola.

1997.- Esta experiencia, que forma el núcleo principal de la parte experimental de la tesis, estaba incluida en el proyecto de investigación titulado "Influencia de factores genéticos y de la temperatura sobre el crecimiento de la lubina", financiado por la CICYT mediante el proyecto CYTMAR MAR96-1831. En este caso, mediante el empleo de rangos de temperatura más amplios, se incide en el objetivo general del experimento anterior. Además, se pretende valorar si el efecto de la temperatura difiere sustancialmente en función del genotipo de los ejemplares. Para ello se emplearon dos lotes de *D. labrax* de distinto origen geográfico (*D. labrax* atlántica y mediterránea), procedentes de reproductores genéticamente distintos. En este sentido, la significación de los resultados que hemos obtenido al acometer este último objetivo es limitada, ya que la mortalidad de los ejemplares de *D. labrax* mediterránea fue muy elevada. Este hecho nos lleva a considerar con cautela los aspectos comparativos sobre la dinámica de crecimiento de ambos lotes de *D. labrax*.

1998.- Experimento adicional donde se pretende valorar el efecto que ejerce el empleo de temperaturas de incubación superiores a las de los casos anteriores. En las experiencias anteriores (1996 y 1997) pudimos comprobar que las diferentes temperaturas de incubación no modificaban significativamente el número de fibras a la eclosión, lo cual contrasta con estudios realizados en otras especies (*C. harengus*, Vieira y Johnston, 1992; Johnston *et al.*, 1995). Por ello, esta prueba la realizamos con la finalidad de verificar la hipótesis de que, en *D. labrax*, dentro del

rango óptimo, la temperatura de incubación ejerce un mínimo efecto sobre la hiperplasia de la musculatura axial durante las fases embrionaria y prelarvaria, y en consecuencia, sobre el número total de fibras.

El cultivo acuícola de *D. labrax* presenta todavía algunos problemas que entorpecen bastante su producción: una gran variabilidad en la calidad de la puesta, grandes diferencias en la tasa de crecimiento dentro de un mismo lote, etc; hechos que, en consecuencia, dificultan el diseño y evaluación de las dietas. Además, a nivel industrial se observa que el comportamiento de esta especie frente a la temperatura difiere entre lotes. Todos estos factores caracterizan, en gran medida, uno de los aspectos más relevantes de este estudio, como es el haber sido realizado en condiciones reales de cultivo acuícola intensivo. Por esta razón, resulta difícil establecer comparaciones entre los resultados obtenidos en los diferentes lotes empleados. En cada uno de ellos, tanto los efectos parentales (genotipo) -que influyen en la calidad de la puesta-, como los efectos medioambientales (temperatura), interaccionan de forma difícilmente evaluable y estandarizable. Por eso, no resulta fácil pensar en una rápida obtención de conclusiones globales sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento de ésta u otras especies acuícolas. No obstante, a pesar de la interrelación de los numerosos factores que influyen sobre el crecimiento y supervivencia larvarios, la realización de estos experimentos y la interpretación de los resultados obtenidos nos han conducido a una serie de conclusiones (enunciadas en el apartado correspondiente), que han de servir de base para futuros estudios que permitan seguir avanzando en el conocimiento del efecto de la temperatura sobre la dinámica de crecimiento de la musculatura de *D. labrax*.

II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II-1. ESTRUCTURA DE LA MUSCULATURA AXIAL DE LOS TELEÓSTEOS.

La musculatura axial de los peces está constituida por segmentos funcionales o miómeros, dispuestos de modo seriado y separados entre sí por láminas de tejido conectivo o mioseptos (Rojo, 1988). En cada miómero se distinguen 2 zonas, una dorsal o epiaxial y otra ventral o hipoaaxial, separadas por un septo horizontal. Ambas zonas constituyen los músculos dorsales y ventrales, respectivamente.

La sección transversal del miotomo permite diferenciar 3 estratos musculares:

1) Estrato superficial (músculo rojo), compuesto de fibras de pequeño diámetro con metabolismo oxidativo y baja actividad mATPasa.

2) Estrato profundo (músculo blanco), que en la mayoría de especies representa prácticamente el espesor completo de los miómeros, y está formado por fibras de gran diámetro, con metabolismo glicolítico y baja actividad mATPasa.

3) Estrato intermedio (músculo rosa), formado por fibras con propiedades histoquímicas diversas y diámetros variables.

II-1.1. TIPOS DE FIBRAS DE LA MUSCULATURA AXIAL DE LOS PECES TELEÓSTEOS.

El estudio histológico de los 3 estratos musculares ha revelado que su población fibrilar no es totalmente homogénea, sino que, junto a las fibras rojas, rosas y blancas, se describen otros tipos fibrilares minoritarios (Ogata, 1958a,b; Guth y Yellin, 1971; Johnston *et al.*, 1975; Mosse y Hudson, 1977; Akster y Osse, 1978; Van Raamsdonk *et al.*, 1978, 1980; Tatarczuch y Kilarski, 1982; Akster, 1983; Te Kronnie *et al.*, 1983; Kilarski y Kozłowska, 1983, 1985; Zawadowska y Kilarski, 1983), que serán mencionados posteriormente.

Las propiedades histoquímicas de los 3 tipos principales de fibras (rojas, rosas y blancas) varían entre especies (Carpene *et al.*, 1982), por lo que no es posible definir un comportamiento estándar de los estratos musculares de los peces teleósteos. No obstante, poseen una serie de aspectos característicos, que se describen a continuación.

II-1.1.1. MÚSCULO ROJO.

Desde el punto de vista histoquímico, las fibras rojas tienen baja actividad mATPasa (alcalino y ácido lábil) (Nag, 1972; Johnston *et al.*, 1975; Mosse y Hudson, 1977; Carpene *et al.*, 1982; Tatarczuch y Kilarski, 1982; Sanger *et al.*, 1989; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; López-Albors *et al.*, 1998). Esta baja actividad mATPasa es similar a la mostrada por las fibras tipo I o SO de los mamíferos (Carpene *et al.*, 1982; Sanger *et al.*, 1988; Zawadowska y Tatarczuch, 1990), por lo que se les considera como fibras de contracción lenta y fatigoresistentes. La similitud con las fibras tipo I o SO de los mamíferos también se pone de manifiesto en que ambas tienen alto contenido en enzimas características del *metabolismo* aeróbico, lo que se evidencia empleando las reacciones metabólicas SDH y NADH-TR (Johnston *et al.*, 1975; Patterson *et al.*, 1975; Akster y Osse, 1978; Van Raamsdonk *et al.*, 1978; Akster, 1981; Carpene *et al.*, 1982; Tatarczuch y Kilarski, 1982).

Sin embargo, no todas las fibras del músculo rojo tienen las mismas propiedades histoquímicas. Así, se han descrito fibras de contracción rápida en especies como el mjol, *Mugil capito* L., trucha común, *Salmo trutta* L., y pez gato, *Ictalurus melas* Raf.,

(Rowlerson, 1985). También se han encontrado variaciones en algunas especies, como en *M. capito*, en función de la salinidad y la temperatura del agua (Carpene *et al.*, 1982).

Las técnicas inmunohistoquímicas han contribuido también a un mejor estudio de la musculatura lateral de los peces. En numerosas especies, a pesar de la falta de especificidad de algunos sueros, la combinación de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas ha permitido definir un músculo rojo de estructura fibrilar heterogénea (Mosse y Hudson, 1977; Akster y Osse, 1978; Akster, 1983; Tatarczuch y Kilarski, 1982; Te Kronnie *et al.*, 1983; Kilarski y Kozłowska, 1985; Veggetti *et al.*, 1993; Mascarello *et al.*, 1995; Ramírez Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; Ibabe, 1997; López-Albors *et al.*, 1998). De este modo, aunque el músculo rojo está constituido mayoritariamente por fibras rojas “típicas”, se describen también poblaciones fibrilares minoritarias con propiedades contráctiles propias y diferentes. Dentro de este grupo, destacamos las llamadas *fibras tónicas*. Se consideran fibras tónicas del músculo rojo, las fibras del “borde muscular rojo” (Van Raamsdonk *et al.*, 1978), las “fibras desplazadas” (Willemsse y De Rutter, 1979; Tatarczuch y Kilarski, 1982; Kiran y Talesara, 1985), las “rojas profundas” (Akster, 1981), “otras rojas” (Mosse y Hudson, 1977), las “fibras de pequeño diámetro” (Mosse y Hudson, 1977; Tatarczuch y Kilarski, 1982), las “rojas de las rosetas” (Scapolo *et al.*, 1988; Ramírez-Zarzosa, 1992; López-Albors *et al.*, 1998; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998) o “rojas en crecimiento” (Patterson *et al.*, 1975; Akster y Osse, 1978).

Desde el punto de vista funcional, Patterson *et al.* (1975) sugirieron que las fibras tónicas eran fibras en crecimiento, aunque otros autores no están de acuerdo con esta interpretación (Van Raamsdonk *et al.*, 1980). Según Carpene *et al.* (1982) pueden estar especializadas en la comunicación visual y acústica.

López Albors *et al.* (1998) y Ramírez-Zarzosa *et al.* (1998) indicaron que las rosetas del músculo rojo son puntos concretos de génesis de nuevas fibras rojas y que, además, contienen algunas fibras equiparables histoquímicamente a las fibras de contracción tónica, descritas en ciertos músculos de mamíferos y aves (Pierobon-Bormioli *et al.*, 1980; Te Kronnie *et al.*, 1981; Barnard *et al.*, 1982; Rowlerson, 1995). Las rosetas aparecen a modo de agrupaciones fibrilares heterogéneas, que, a partir del septo horizontal, se disponen de forma salteada hacia los límites epi- e hipoaxiales. Están integradas por fibras con diferentes perfiles mATPásicos: predominan las fibras con alta actividad mATPasa alcalino y ácidoestable, si bien se describen también fibras con una actividad moderada y escasa (semejante a las fibras rojas adultas).

En los estadios juveniles y adultos de dorada, *Sparus aurata* L., y lubina, *Dicentrarchus labrax* L., ha sido descrito un *mosaico muscular rojo* (Ramírez-Zarzosa, 1992; López-Albors, 1994; Mascarello *et al.*, 1995), formado por fibras de pequeño tamaño y alta actividad mATPasa dispuestas entre las fibras rojas adultas. La aparición de dicho mosaico se corresponde con la gran capacidad de crecimiento y el tamaño final alcanzado por estas dos especies.

Desde el punto de vista ultraestructural, las fibras rojas han sido descritas en numerosos trabajos: Kilarski (1967), Waterman (1969), Nag (1972), Franzini-Armstrong (1973), Van Raamsdonk *et al.* (1978), Proctor *et al.* (1980), Slinde y Krivi (1980), Te Kronnie *et al.* (1983), Shindo *et al.* (1986), Veggetti *et al.* (1990), Sanger (1991), Mascarello *et al.* (1995), Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995, 1998).

Las fibras rojas, al igual que las fibras lentas de los mamíferos y aves, son de pequeño tamaño y de menor diámetro que las blancas de contracci3n rápida (Johnston *et al.*, 1975; Carpene *et al.*, 1982; Kilarski y Kozłowska, 1985). Sus diámetros oscilan segun las especies entre 10-50 μm ., si bien Greer-Walker (1970) observ3 diferencias dentro de un mismo individuo, encontrando un ligero aumento del diámetro de las fibras a medida que se analizaban zonas más pr3ximas a la aleta caudal. El rasgo más característico de las fibras rojas es la gran cantidad de mitocondrias, que oscila entre un 30-60% (Johnston, 1979) o incluso un 78% (Kilarski *et al.*, 1992). En *S. aurata* (Ayala *et al.*, 1999) el porcentaje de mitocondrias es aproximadamente de un 66.6% durante la primera mitad del desarrollo larvario, lo que ha sido relacionado con su papel en la respiraci3n larvaria a trav3s de la piel. Posteriormente disminuye hasta un 55% a los 73-78 días. Estos porcentajes hallados en las fibras rojas de los peces, con frecuencia superan los encontrados en los músculos más activos de mamíferos, y en general en las fibras tipo I o SO.

Además de su cantidad, tambi3n llama la atenci3n la disposici3n de las mitocondrias, no s3lo rodeando las miofibrillas, sino tambi3n situándose entre ellas (Shindo *et al.*, 1986). Los núcleos se localizan normalmente en la periferia de las fibras, preferentemente hacia la membrana interna (Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998). Las fibras rojas contienen tambi3n miofibrillas en un 40-60% (Johnston, 1980) y retículo sarcoplásmico y sistemas de túbulos T, menos abundantes que en las fibras blancas (Johnston, 1980), pero más que en las fibras t3nicas de otros vertebrados. La disposici3n de las miofibrillas es radiada (Bone, 1978; Akster, 1981, 1983; Kilarski y Kozłowska, 1987) o formando anillos y bucles (Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa, 1992;

Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998). El glucógeno, más abundante que en las fibras blancas, se dispone en el sarcoplasma formando rosetas o pequeñas cadenas.

La *cantidad o proporción* de músculo rojo en las distintas especies depende, en gran medida, de sus características natatorias. Así, en peces cuyo comportamiento natatorio se basa en una natación constante, el músculo rojo es muy abundante; tal es el caso del boquerón, *Engraulis encrasicolus* (L.), cuyo músculo rojo a nivel de la abertura anal constituye el 38% de la musculatura total (Johnston, 1989). Por el contrario, en especies como la trucha arco iris, *Onchorinchus mykiss* Richardson, no supera el 4% (Webb, 1970). En un mismo individuo hay diferente proporción de músculo rojo dependiendo del nivel donde se realice la sección muscular. El músculo rojo resulta más abundante en los miómeros más caudales, por lo que se le relaciona con los movimientos natatorios (Nag, 1972; Gill *et al.*, 1982; Johnston, 1989). La proporción de músculo rojo varía también en las fases iniciales larvarias, en las que se observa el máximo porcentaje de músculo rojo respecto al total del miotomo. Esto da lugar a un aumento de la superficie corporal a través de la cual, el músculo rojo participa en la respiración cutánea en ausencia de agallas funcionales, tal y como se ha descrito en ciprínidos (El-Fiky *et al.*, 1987), en el arenque, *Clupea harengus* L. (De Silva, 1975), y en *S. aurata* (Ayala *et al.*, 1999).

Otro factor que influye notablemente en la cantidad de músculo rojo es la temperatura del agua (Malessa, 1969; Walesby y Johnston, 1980; Johnston, 1989), detectándose un incremento de la proporción de este músculo con la aclimatación al frío. Esto se explicaría por la necesidad de desarrollar una natación sostenida a bajas velocidades en aguas casi congeladas. Esta hipótesis parece corroborarla Johnston (1982), al observar que diferentes peces de la Antártida tenían una proporción de músculo rojo de hasta el 11.2%.

Desde el punto de vista funcional, se considera que el músculo rojo está implicado en la natación sostenida a baja velocidad (cruce) (Andersen *et al.*, 1963; Bone, 1966; Bokdawala, 1967; Rayner y Krenan, 1967; Webb, 1970; Smith *et al.*, 1971; Johnston *et al.*, 1972, 1975; Patterson *et al.*, 1975; Mosse y Hudson, 1977; Carpene *et al.*, 1982). Otros autores sugieren que el papel funcional de los diferentes tipos de fibras (rojas, rosas y blancas), es mucho más versátil de lo que se consideraba en un principio (Weatherley y Gill, 1982), por lo que en la mayoría de teleósteos los tres tipos de fibras podrían estar implicados durante la natación sostenida (Smith *et al.*, 1971; Hudson, 1973; Greer-Walker y Pull, 1975; Bone, 1978; Johnston, 1980).

Por otro lado, durante el desarrollo de muchos teleósteos, el perfil histoquímico y los caracteres morfológicos de las fibras musculares rojas frecuentemente divergen de los que presentan en los peces adultos (Van Raamsdonk *et al.*, 1978; 1980; El-Fiky *et al.*, 1987; Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1993; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995), y esto podría tener un significado funcional. Así, Mascarello *et al.* (1995) evidenciaron que, en las fases iniciales de *S. aurata*, la musculatura roja (dispuesta en monocapa) no responde desde el punto de vista histoquímico a una función de contracción lenta. Esto puede estar relacionado con el papel funcional que desempeña este músculo en la respiración inicial larvaria, tal y como hemos expuesto anteriormente.

II-1.1.2. MÚSCULO BLANCO.

Generalmente, y empleando técnicas *histoquímicas*, las fibras blancas tienen alta actividad mATPasa (preincubación alcalina), y muestran baja actividad las enzimas aeróbicas (Akster y Osse, 1978). Sin embargo, el comportamiento mATPásico de las fibras blancas es difícil de tipificar, pues está influido por distintos factores, como las técnicas y tiempos de incubación empleados (Johnston *et al.*, 1974; Mascarello *et al.*, 1986; Sanger *et al.*, 1989; Zawadowska y Tatarczuch, 1990) y también por la apariencia de mosaico que se aprecia cuando coexisten en el músculo fibras de diferente tamaño y naturaleza miosínica (Carpene *et al.*, 1982; Rowleron *et al.*, 1985).

En postlarvas de *S. aurata* y *D. labrax*, López-Albors *et al.* (1998) y Ramírez-Zarzosa *et al.* (1998), utilizando el método B descrito por Mascarello *et al.* (1986) (preferiblemente preincubación ácida), observan un mosaico formado por 3 tipos de fibras: a) fibras grandes con baja actividad mATPasa; b) fibras pequeñas con alta actividad mATPasa; c) fibras medianas con moderada actividad mATPasa. Scapolo *et al.* (1988) observaron un mosaico de tamaños fibrilares en el músculo blanco de *D. labrax* a los 80 días, pero éstas no mostraban actividad mATPasa hasta los 20 meses. En este momento la actividad mATPasa (método B) fue alcalinoestable en todas las fibras, pero su acidoestabilidad variaba en función del tamaño fibrilar, de forma que las fibras pequeñas eran más cidoestables. El perfil inmunológico de estas fibras pequeñas era también diferente de las fibras de mayor tamaño (Scapolo *et al.*, 1988), mostrando una reacción positiva frente a los sueros de miosina rápida y lenta, tal y como habían encontrado Rowleron *et al.* (1985) en la carpa, *Cyprinus carpio* L., y la anguila, *Anguilla anguilla* L.

En postlarvas de *S. aurata*, Mascarello *et al.* (1995) observaron que las fibras de pequeño diámetro del mosaico blanco tenían distinto perfil mATPásico a las de mayor diámetro, coincidiendo con el resto de estudios mencionados anteriormente, pero, sin embargo, la reacción inmunológica de estas fibras era similar a la de las fibras grandes (positiva frente a suero de miosina rápida).

El *metabolismo* de las fibras blancas puede considerarse fundamentalmente glicolítico, dada su débil reacción SDH y NADH-TR, escasez de glucógeno (PAS negativo) y de lípidos (SUDAN negativo) (Matsuoka, 1984; Shindo *et al.*, 1986). No obstante, algunos autores (Johnston *et al.*, 1975; Korneliussen *et al.*, 1978; Mosse, 1979; Tatarczuch y Kilarski, 1982) han encontrado fibras blancas con actividad oxidativa intermedia o incluso elevada (Patterson y Goldspink, 1976). Este hallazgo puede, en cierto modo, relacionarse con el diferente comportamiento natatorio de las diferentes especies.

Ultraestructuralmente, las fibras blancas tienen forma poligonal y están ocupadas casi totalmente por miofibrillas, entre un 80-96% según Johnston y Moon (1981). Estas miofibrillas se presentan empaquetadas y se distribuyen radialmente en torno al eje central del sarcoplasma (Sänger *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1992). Esta disposición es típica en teleósteos, y no se ha observado en elasmobranquios y holocéfalos (Johnston y Moon, 1981). El sarcoplasma raramente contiene depósitos de glucógeno y vacuolas de grasa. Las mitocondrias son escasas, de pequeño tamaño, con crestas cortas y tubulares, y suelen situarse en la periferia de las fibras (Sänger *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998). El retículo sarcoplásmico es más abundante y sus cisternas más dilatadas que en las fibras rojas (Johnston y Moon, 1981; Sänger *et al.*, 1990; Veggetti *et al.*, 1990). El tamaño de estas fibras varía en función de la existencia o no de un mosaico muscular blanco, aunque en general es mayor que el de las rojas (Johnston *et al.*, 1975; Barends, 1979; Proctor *et al.*, 1980; Kilarski y Kozłowska, 1985).

Desde el punto de vista *funcional*, el músculo blanco es de contracción rápida y fatigosensible. El músculo blanco es el estrato más profundo y más amplio del miotomo, llegando a ocupar la mayor parte del mismo. La proporción de músculo blanco varía en un mismo individuo al igual que el músculo rojo, pero, al contrario que éste, resulta más abundante en las zonas craneales, para decrecer hacia los miómeros más caudales.

II-1.1.3. MÚSCULO ROSA.

El músculo rosa se define como el estrato de fibras situadas entre el músculo rojo y blanco. Su cantidad y composición fibrilar es variable en función de la especie. Este músculo aparece hacia el final del desarrollo larvario en *S. aurata* (Mascarello *et al.*, 1995; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; López-Albors *et al.*, 1998) y *D. labrax* (Scapolo *et al.*, 1988; Mascarello *et al.*, 1995; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; López-Albors *et al.*, 1998).

Histoquímicamente, la miosina de las fibras rosas se caracteriza por una particular resistencia a las preincubaciones ácidas y alcalinas (Johnston *et al.*, 1974, 1975; Akster y Osse, 1978; Van Raamsdonk *et al.*, 1978, 1980, 1982; Te Kronnie *et al.*, 1983; Rowleron *et al.*, 1985; Mascarello *et al.*, 1986; Scapolo *et al.*, 1988; Sängner *et al.*, 1989a; Mascarello *et al.*, 1995; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998; López-Albors *et al.*, 1998). No obstante, hay especies como *O. mykiss* e *I. melas* (Mascarello *et al.*, 1986) y *C. carpio* (Akster, 1983) en las que el músculo rosa tiene actividad mATPasa ácido y alcalino lábil.

Las fibras del músculo rosa presentan distinto tamaño y diferente actividad mATPasa dependiendo de la especie (Nag *et al.*, 1972; Mosse y Hudson, 1977; Van Raamsdonk *et al.*, 1978; Proctor *et al.*, 1980; Rowleron *et al.*, 1985; Mascarello *et al.*, 1986). En *D. labrax* y *S. aurata*, la actividad mATPasa es detectada a los 120 días (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995). Estas fibras aparecen más tarde que las fibras rojas y blancas, pero adquieren sus características histoquímicas más rápidamente (Scapolo *et al.*, 1988). Es probable que el origen de estas fibras derive de una población de mioblastos próxima al presuntivo músculo rojo, detectado durante el estadio larvario (Romanello *et al.*, 1986; Scapolo *et al.*, 1987, 1988; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998). No obstante, Van Raamsdonk *et al.* (1982) sugirieron que las fibras intermedias del pez cebra, *Brachidanio rerio* Hamilton-Buchanan, se originaban a partir de las fibras musculares blancas.

El final de la vida larvaria de *S. aurata* y *D. labrax* coincide con la madurez de la estructura esquelética de las aletas, y la aparición de la habilidad para realizar movimientos rápidos natatorios (Barnabé, 1976a), por lo que Ramírez-Zarzosa *et al.* (1998) consideran probable que el principal papel del músculo rosa en ambas especies sea facilitar la habilidad natatoria, como se ha demostrado en *C. carpio* (Johnston *et al.*, 1977; Johnston, 1982). Por su parte, López-Albors *et al.* (1998) encontraron en los bordes más internos y externos del músculo intermedio de *D. labrax* y *S. aurata* dos zonas de transición muscular descritas histoquímicamente a los 150 días y a los 170 días, respectivamente. La existencia

de tales zonas de transición ha sido descrita también en otras especies de teleósteos (Johnston y Lucking, 1978; Rowleron *et al.*, 1985; Mascarello *et al.*, 1986; Sänger *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1993). Estas zonas de transición han sido asociadas con los procesos de transformación de los tipos de fibras musculares (Johnston y Lucking, 1978; Mascarello *et al.*, 1986; Sänger *et al.*, 1988) y con las áreas de crecimiento muscular del miotomo (Sänger *et al.*, 1988). De acuerdo con estos autores, López-Albors *et al.* (1998) sugieren, a partir de sus resultados, que el músculo intermedio de *D. labrax* y *S. aurata* no está sólo implicado en la natación, sino también en el crecimiento del miotomo. En este sentido, se le atribuye la función apuntada por Bone (1960) y Mosse y Hudson (1977), de ser una zona de continua génesis y transformación fibrilar (reemplazamiento).

Las fibras del músculo rosa presentan una *actividad oxidativa y glicolítica* intermedia respecto a los otros dos músculos (Bokdawala y George, 1967; Johnston *et al.*, 1974; Patterson *et al.*, 1975; Carpenne *et al.*, 1982; Tatarczuch y Kilarski, 1982; López-Albors *et al.*, 1998), carácter intermedio que se refleja también en los depósitos de glucógeno y de lípidos (Carpenne *et al.*, 1982).

Ultraestructuralmente, las fibras rosas presentan características intermedias a las fibras rojas y blancas (Van Raamsdonk *et al.*, 1978; Akster, 1981; Te Kronnie *et al.*, 1983; Kilarski y Kozłowska, 1985, 1987). El retículo sarcoplásmico es abundante y los depósitos de glucógeno bastante frecuentes. La presencia de mitocondrias es alta y están situadas tanto en la periferia como en el centro de las fibras.

Respecto a la *cantidad* de músculo rosa, varía considerablemente según la especie (Carpenne *et al.*, 1982; Rowleron *et al.*, 1986; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1991). Así, mientras en *M. capito* y *C. carpio* es grande, en el guppy, *Poecilia reticulata* L., es muy pequeña (Mascarello *et al.*, 1986) y casi inexistente en *A. anguilla* (Rowleron *et al.*, 1985; Romanello *et al.*, 1987).

Desde el punto de vista *funcional*, las fibras rosas se catalogan como de contracción rápida y fatigoresistentes, ya que muestran niveles de actividad histoquímica y metabólica intermedios respecto a las fibras rojas y blancas. Por sus características histoquímicas, Johnston *et al.* (1977) consideran que el músculo rosa se utilizaría durante la natación sostenida a velocidades relativamente elevadas. Sin embargo, en opinión de Carpenne *et al.* (1982), parece dudoso que exista una correlación entre la amplitud del músculo rosa y la capacidad para realizar una natación sostenida, tal y como afirman Bokdawala (1967) y Patterson *et al.* (1975), ya que peces como los del género Hemiramphos (de gran aptitud natatoria) no tienen músculo rosa (Mosse y Hudson, 1977). Como ya hemos mencionado,

para Bone (1966) y Mosse y Hudson (1977), la función de la musculatura rosa es la de ser una zona de continuo reemplazamiento de fibras. Esta hipótesis parece apropiada para explicar sus particularidades en algunas especies como *M. capito*.

II-2. GÉNESIS Y MECANISMOS DE CRECIMIENTO MUSCULAR DURANTE EL DESARROLLO DE LOS TELEÓSTEOS.

El crecimiento de la musculatura axial de los peces se caracteriza por su capacidad para aumentar tanto el número (hiperplasia) como el tamaño de sus fibras (hipertrofia). Mientras en mamíferos, la hiperplasia fibrilar está normalmente restringida a los períodos pre- y perinatal (Goldspink, 1972; Ontell y Dunn, 1978; Champion, 1984), en la mayoría de los teleósteos el crecimiento hiperplásico ocurre también durante los estadios larvario y juvenil (Stickland, 1983; Matsuoka, 1984; Romanello *et al.*, 1987; Weatherley *et al.*, 1988; Higgins y Thorpe, 1990).

Durante las fases embrionaria y larvaria, tienen lugar tanto fenómenos de crecimiento como de desarrollo muscular. El desarrollo implica la génesis de nuevas fibras y su diferenciación, ya que, inicialmente son inmaduras y progresivamente adquieren las características de las fibras adultas.

En el pez pueden distinguirse tres fases de formación muscular. La primera fase da lugar a la formación de fibras musculares embrionarias junto con una población de mioblastos indiferenciados que son la fuente del crecimiento posterior. En la segunda fase del crecimiento, observada en la larva con saco vitelino, se distinguen zonas germinales de proliferación de mioblastos en los ápices dorsal y ventral de los miotomos (Veggetti *et al.*, 1990; Brooks y Johnston, 1993; Rowleron *et al.*, 1995). Finalmente, los mioblastos situados entre las fibras musculares adultas se activan para generar nuevas fibras, un proceso que puede continuar a lo largo de la vida adulta del pez (Koumans *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1995; Rowleron *et al.*, 1995). Los mioblastos indiferenciados observados a nivel ultraestructural, parecen estar constituidos por una mezcla de células precursoras musculares y una población de mioblastos en proliferación determinados a diferenciarse. Al menos en algunas especies, estos mioblastos empiezan a enclaustrarse dentro de la lámina basal de fibras musculares existentes durante el estadio larvario y son genéricamente denominados células satélites o miosatélites (Veggetti *et al.*, 1990).

II-2.1. DESARROLLO MUSCULAR EN EL EMBRIÓN: MIOGÉNESIS.

Durante el período embrionario acontece la organogénesis, que incluye el desarrollo de la musculatura lateral. A continuación describimos de forma general los resultados hallados hasta ahora en diversas especies de peces, relativos a la miogénesis y la organización fibrilar en esta etapa.

II-2.1.1. MIOGÉNESIS.

La miogénesis de los diferentes tipos de fibras es escasamente conocida. Los primeros estudios en este sentido se realizaron en *B. rerio* (Waterman, 1969). Durante la fase embrionaria de esta especie (aproximadamente de 3 días), se produce un proceso gradual de diferenciación de los miotomos a partir de los somitos, integrados por una población de células mesenquimatosas que dan lugar a los miocitos. Inicialmente (24h. postfertilización), los miofilamentos se forman en células mononucleadas alargadas, próximas a la notocorda (Waterman, 1969; Van Raamsdonk *et al.*, 1974). A las 40-45h. de la fertilización, tras un proceso de diferenciación en sentido mediolateral de las células iniciales (consideradas mioblastos), el miómero queda integrado por tres estratos fibrilares: una capa de células externas situadas en la superficie, una monocapa subyacente de fibras superficiales y un conjunto de varias capas de células profundas que ocupan el resto del miotomo. Waterman (1969) consideró, en base a sus resultados, que las fibras superficiales y profundas son diferentes desde su formación, y dan lugar a fibras adultas mediante mecanismos independientes.

Por su parte, en embriones de *B. rerio*, Van Raamsdonk *et al.* (1978) encontraron a las 24h. (18 somitos), una capa simple de fibras próximas a la notocorda. Tanto el perfil inmunológico de la miosina de estas fibras, como las del resto del miómero era similar al encontrado posteriormente en las fibras de la monocapa superficial. En base a esto, Van Raamsdonk *et al.* (1978) no consideran que las fibras superficiales y profundas vayan a ser precursoras de las fibras rojas y blancas adultas, respectivamente, sino que será a partir de un único tipo de fibra (“roja embrionaria”) como se originarán las futuras poblaciones adultas.

En *S. trutta*, Nag y Nursall (1972) encontraron que las fibras blancas internas eran las primeras en formarse, y el estrato superficial no queda definido hasta el estadio de vida

libre. Proctor *et al.* (1980) examinaron también el embrión de *S. trutta*, y encontraron que las fibras internas eran las primeras en contener miofibrillas bien organizadas, pero una monocapa superficial reconocible estaba también presente.

Tal y como se pone de manifiesto en estos trabajos, no hay acuerdo acerca de la posición de las células precursoras miogénicas específicas de cada tipo fibrilar, así como sobre la secuencia temporal mediante la que se generan dichos tipos de fibras. Con el fin de avanzar en el conocimiento de estos procesos, Devoto *et al.* (1996) examinaron el desarrollo embrionario de la musculatura axial de *B. rerio* y hallaron dos poblaciones de células precursoras: las células mediales (células adaxiales), grandes, cuboides y adyacentes a la notocorda, y las células laterales (presomíticas laterales), más pequeñas e irregulares, y separadas de la notocorda por las células adaxiales. Las células adaxiales comienzan a expresar las propiedades de las fibras lentas cuando están en el interior del miotomo. Posteriormente estas células migran a la posición superficial, a la vez que las células laterales comienzan a diferenciarse en fibras rápidas. Estos estudios coinciden con estudios previos en amniotas, que sugerían que en los mioblastos embrionarios está ya especificado el tipo de fibra al que se van a diferenciar (Waterman, 1969; Stockdale, 1992).

Dichos autores también encontraron que una subpoblación de células adaxiales no migra completamente a la superficie lateral del miotomo, sino que se extiende desde la notocorda a la superficie lateral del somito a nivel del futuro septo horizontal. El comportamiento y posición de este subgrupo de células es semejante al descrito para los “músculos pioneros” (Hatta *et al.*, 1991). Los músculos pioneros son una subpoblación de células musculares identificadas previamente en *B. rerio* (Felsenfeld *et al.*, 1991), y se corresponden con las primeras fibras diferenciadas en esta especie próximas a la notocorda, alargadas y mononucleadas (Waterman, 1969; Van Raamsdonk *et al.*, 1974, 1978). Estas fibras desempeñan un papel morfogénico en la formación del tronco muscular y del septo horizontal (Hatta *et al.*, 1991; Ekker *et al.*, 1992). En embriones de *C. harengus*, Johnston *et al.* (1995, 1997) observaron también miotubos en una posición semejante y con una misma morfología a las fibras pioneras descritas en *B. rerio*. Estos autores consideran que constituyen una subpoblación de la presuntiva capa de fibras rojas, que se extiende alrededor de la circunferencia completa del tronco muscular.

La somitogénesis comienza en la zona rostral y procede en sentido caudal, tal y como ha sido establecido en los vertebrados superiores (Stockdale, 1992) y se ha

observado en diversas especies de peces, como en *C. harengus* (Johnston *et al.*, 1995, 1997).

II-2.1.2. POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA MIOGÉNESIS.

La gastrulación da lugar a la formación de tres tejidos mayoritarios en los embriones de los peces (Figura 1a-Fig. 1a): en primer lugar, el mesodermo axial que originará la notocorda, que es considerada la estructura que controla el desarrollo de muchos otros sistemas orgánicos. En segundo lugar, el ectodermo neural, a partir del cual se formará el tubo neural; y en tercer lugar, el mesodermo paraxial que se segmenta posteriormente para formar los somitos, que darán lugar a los miómeros.

Otros procesos importantes acontecen durante los primeros estadios de la embriogénesis. El tubo neural se diferencia en neuronas, que interactuarán con la notocorda para inducir la diferenciación de los somitos. En los somitos se produce una proliferación celular que da lugar a una población de células precursoras somíticas, que finalmente se diferenciarán en mioblastos y miotubos (Fig. 1b).

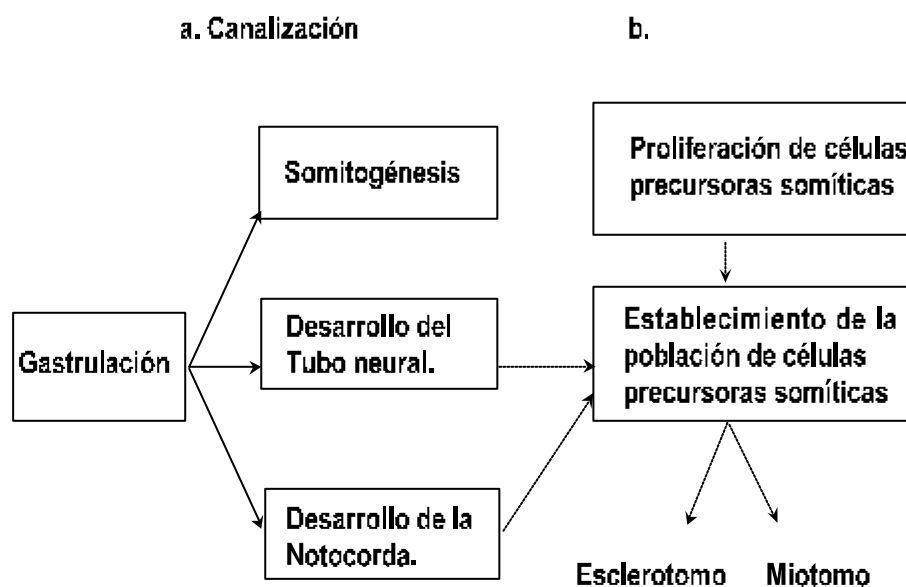


Fig. 1. Posibles mecanismos implicados en la regulación de la miogénesis, extraído de Johnston *et al.* (1996). a) Principales acontecimientos que caracterizan la embriogénesis. Los hechos que acontecen durante la embriogénesis están altamente canalizados. b) Las diferencias relativas en la tasa de división celular en el somito a diferentes temperaturas, afectan a la población de células precursoras finales.

Los mecanismos que regulan el desarrollo inicial de los diferentes tipos de fibras aún no son suficientemente conocidos. No obstante, exponemos a continuación, algunos de los estudios realizados sobre este tema por diversos investigadores.

En primer lugar, los estudios realizados por Johnston *et al.* (1996) en *C. harengus* muestran que los principales acontecimientos que ocurren durante la embriogénesis, entre los que se incluyen la gastrulación y el desarrollo de la notocorda, el tubo neural y los somitos están altamente “canalizados” dentro del rango de temperatura en el que pueden eclosionar los huevos de esta especie (entre 4 y 15-17 °C). De esta forma, aunque todos los órganos aceleran su desarrollo a altas temperaturas, el desarrollo de los órganos primordiales transcurre de forma coordinada o sincrónica, de tal modo que tiene lugar a un punto equivalente del desarrollo entre la fertilización y la eclosión. Así, por ejemplo, dentro del rango de temperaturas indicado, no se observan diferencias relativas (o desfases) en las estructuras identificables en el tubo neural para un estadio de desarrollo embrionario dado (número concreto de somito).

Estos hechos ponen de manifiesto que debe existir una fuerte selección de mecanismos reguladores encargados de desarrollar de forma coordinada estas estructuras, de tal forma que, fuera del rango de temperaturas indicado, estos mecanismos se desacoplan impidiendo el desarrollo normal del embrión y su supervivencia (Johnston *et al.*, 1996).

Por otra parte, otros caracteres del desarrollo embrionario no muestran la canalización o sincronización descrita para los órganos principales, sino que exhiben diferente sensibilidad a la temperatura, dentro del rango de temperaturas indicado. Entre ellos se incluye la duración de la miogénesis, el número de miotubos y de fibras musculares que se forman, así como el número de células ultraestructuralmente semejantes a los mioblastos (Johnston, 1993). Así, en embriones de *C. harengus*, se ha observado que, variaciones de la temperatura (dentro del rango de temperaturas en el que las larvas pueden eclosionar) provocan diferencias relativas en la tasa de división de las células precursoras somíticas, lo que afecta al número final de dichas células.

En consecuencia, la temperatura puede desacoplar la miogénesis y el desarrollo neuronal motor con respecto a la formación de los somitos y otros elementos del sistema nervioso. Los efectos de la temperatura sobre el tiempo relativo de desarrollo de estas estructuras pueden influir en el grado de mortalidad de las larvas, pero aún se requieren rigurosos experimentos para profundizar en esta idea (Johnston *et al.*, 1996). Estos estudios

son muy necesarios porque habitualmente muy pocas larvas de peces marinos llegan a adultos, normalmente menos del 0.1 % (Ferron y Legget, 1994), por lo que, toda mejora en dicho porcentaje es de gran relevancia en acuicultura.

Según los precedentes descritos, Johnston *et al.* (1996) han planteado una serie de hipótesis para explicar el efecto de la temperatura sobre el número de fibras y su grado de diferenciación a la eclosión de los teleósteos. Por un lado, la temperatura es capaz de actuar de forma diferencial sobre la tasa de división de la población de células precursoras somáticas, lo que influye en el número de fibras del miotomo (Fig. 1b); por otra parte, la temperatura puede influir sobre los mecanismos que producen las señales necesarias para la diferenciación de los mioblastos y el establecimiento de sus diferentes poblaciones (Fig. 1a). No obstante, según estos autores, la hipótesis de que la temperatura de incubación es capaz de alterar el número de células precursoras musculares en *C. harengus*, y con ello, el número de fibras musculares del miotomo a la eclosión, se establece asumiendo algunos puntos críticos que deben ser comprobados. Así, hay que cuestionarse, por ejemplo, si el método de identificación de las células precursoras musculares mediante microscopía electrónica es suficientemente inequívoco. De hecho, existen células con características ultraestructurales semejantes a los mioblastos, entre las que se incluyen las células precursoras musculares, mioblastos en proceso de diferenciación terminal, y otras células diferentes de las células precursoras musculares, que pueden alterar los contajes celulares experimentales.

Asimismo, es necesaria una investigación más exhaustiva para caracterizar los factores de transcripción que intervienen en la regulación de la miogénesis (como por ejemplo *myoD*, proteína que forma parte de la familia miogénica “basic helix-loop-helix”, bHLH, la cual desempeña un papel primordial en la regulación de la miogénesis). En este sentido, ya se ha demostrado que, mediante tratamiento de fibroblastos con *myoD* se consigue una síntesis de proteínas miofibrilares, si bien no la formación de miotubos.

En la misma línea que los resultados expuestos anteriormente, Devoto *et al.* (1996) han propuesto que algunos tejidos embrionarios y factores de crecimiento actúan sobre el somito e intervienen en la miogénesis. La notocorda es capaz de inducir y controlar algunos tipos celulares en amniotas, anfibios y teleósteos, incluyendo las células de la placa basal, las neuronas motoras en la médula espinal, el esclerotomo y células precursoras musculares del somito (Brand Saberi *et al.*, 1993; Halpern *et al.*, 1993; Pourquoié *et al.*, 1993, citados por Devoto *et al.*, 1996). La molécula señalizadora Sonic

Hedgehog (Shh) ejecuta algunas de estas propiedades de la notocorda: las células adaxiales, están destinadas a convertirse en mioblastos de músculo lento, bajo la influencia de dicha glicoproteína secretada a partir de la notocorda (Blagden *et al.*, 1997, citados por Kobiyama *et al.*, 1998). Por otro lado, la superficie del ectodermo, el tubo neural y la placa lateral son reguladores potenciales de la miogénesis en el pollo y el ratón (Pourquié *et al.*, 1995, citados por Devoto *et al.*, 1996), y así, miembros de la familia de proteínas Wnt pueden regular la miogénesis a partir del tubo neural (Munsterberg *et al.*, 1995), mientras que el grupo BMP4 la regula desde la placa lateral (Pourquié *et al.*, 1996).

Según estos resultados, parece que el medio ambiente celular en el que se encuentran las células precursoras musculares de las fibras lentas y rápidas puede desempeñar un papel determinante en el establecimiento de los diferentes tipos fibrilares. Antes de su migración radial, las células adaxiales están inmediatamente adyacentes a la notocorda, mientras que las células presomíticas están junto a la superficie del ectodermo. Interacciones entre la notocorda y el mesodermo paraxial, o entre la superficie del ectodermo y el mesodermo paraxial, parece que están involucradas en el desarrollo de la identidad celular (Devoto *et al.*, 1996).

II-2.2. DESARROLLO Y CRECIMIENTO MUSCULAR DURANTE EL PERÍODO LARVARIO.

Desde la eclosión hasta el final de la metamorfosis larvaria, acontecen cambios en la respiración, y en el comportamiento natatorio y alimentario de la larva, que van asociados a la aparición y maduración de los tres estratos musculares definitivos: músculos rojo, blanco y rosa.

A continuación, exponemos las principales investigaciones sobre los procesos de desarrollo y crecimiento de la musculatura lateral. Nos referiremos en primer lugar a las células miogénicas, y posteriormente a los tipos de fibras a la eclosión, incluyendo las células externas. Finalmente se describen los mecanismos de crecimiento muscular y las diferentes transiciones miosínicas de las fibras musculares durante su desarrollo.

II-2.2.1. CÉLULAS MIOGÉNICAS.

El desarrollo y crecimiento muscular depende de la actividad de las células miogénicas existentes en los períodos embrionario, larvario y postlarvario.

En todas las especies de peces estudiadas, la mayoría de fibras musculares embrionarias surgen de la fusión de algunos **mioblastos** para formar fibras musculares multinucleadas (Waterman, 1969; Nag y Nursall, 1972; Van Raamskonk *et al.*, 1978). Los tipos de fibras musculares embrionarias rojas y blancas pueden ser distinguidas en base a sus características morfológicas (Waterman, 1969; Vieira y Johnston, 1992), histoquímicas (Van Raamskonk *et al.*, 1978; Batty, 1984) e inmunocitoquímicas (Mascarello *et al.*, 1995).

La *terminología* que se aplica a estas células varía según los autores y las técnicas de estudio empleadas. En base a sus características morfológicas, observadas con el microscopio electrónico, se denomina **presuntivo mioblasto** a la célula parcialmente diferenciada, con alta actividad mitótica, e indistinguible de las células del mesénquima. Las células postmitóticas, que adquieren una forma fusiforme y comienzan a fabricar proteínas musculares específicas, son llamadas **mioblastos**, que, a su vez, se fusionan formando **miotubos** (Waterman, 1969; Holzer, 1970; Fishman, 1972; Schattenberg, 1973; Turner, 1978; Veggetti *et al.*, 1990).

En general, el término mioblasto se aplica a todas las células musculares precursoras mononucleadas; tales mioblastos tienen capacidad de migración, proliferación y fusión (Feldman y Stockdale, 1992). Dado que se describen sucesivas fases de formación de nuevas fibras musculares, en los *vertebrados superiores* se distinguen mioblastos embrionarios (que se fusionan formando miotubos primarios), mioblastos fetales (que se fusionan en miotubos secundarios) y mioblastos adultos (**miocitosatelocitos, células miosatélites o células satélites**), que aparecen al final de la vida fetal y son responsables de la adición de núcleos musculares durante el crecimiento hipertrófico (Feldman y Stockdale, 1992) y la regeneración de las fibras musculares (Campion, 1984). Las células miosatélites fueron definidas por Mauro (1961), y están situadas entre el sarcolema y la lámina basal de fibras musculares completamente diferenciadas. Contienen un núcleo heterocromático y una pequeña cantidad de citoplasma que, con la excepción de algunos ribosomas libres y polisomas, contiene pocas organelas. Las células miosatélites que están aún presentes bajo la lámina basal pero contienen miofilamentos, son llamadas **fibras miosatélites** (Takahama *et al.*, 1984).

En los vertebrados superiores, las primeras fibras musculares formadas (miotubos primarios) sirven como soporte esencial, alrededor del cual, se desarrollan los miotubos secundarios (Ontell y Kozeka, 1984; Ashby *et al.*, 1993). Como resultado, las fibras musculares procedentes de diferentes generaciones de miotubos se encuentran entremezcladas en el músculo adulto. Por el contrario, en los **teleósteos**, el crecimiento del miotomo acontece por diferentes mecanismos que se suceden a lo largo de la vida embrionaria, larvaria y postlarvaria (Stoiber y Sanger, 1996). En el embri3n, el miotomo lo constituyen fibras musculares derivadas directamente de c3lulas precursoras som3ticas. Poco despu3s de la eclosi3n, se describe un crecimiento aposicional del miotomo por diferenciaci3n de c3lulas precursoras localizadas en la periferia. De este modo, las nuevas fibras producidas permanecen juntas dispuestas sobre las fibras que se formaron durante la vida embrionaria (Veggetti *et al.*, 1990; Brooks y Johnston, 1993; Koumans y Akster, 1995). Adem3s, en los tele3steos de gran tamaño, tiene lugar un tercer mecanismo de crecimiento hiperpl3sico, por el cual muchas de las c3lulas precursoras (mioblastos presuntivos) de la periferia, migran hacia el interior del miotomo a trav3s de los mioseptos (Stoiber y Sanger, 1996). As3, aparecen pequeñas fibras alrededor de las fibras maduras de mayor di3metro, dando la apariencia de mosaico; y, a nivel del septo transversal, se constituye una zona de g3nesis de nuevas fibras entre los m3sculos rojo y blanco (Weatherley *et al.*, 1979; Carpeno y Veggetti, 1981; Stickland, 1983; Romanello *et al.*, 1987; Talesara y Urfi, 1987; Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990).

Como consecuencia del tercero de los mecanismos enunciados, los estadios larvarios de la mayor3a de especies de peces estudiadas, incluyendo *D. labrax* (Veggetti *et al.*, 1990), *C. harengus* (Johnston, 1993) y varias especies de cipr3nidos (Stoiber y Sanger, 1996) poseen mioblastos libres indiferenciados dispersados entre las fibras musculares. Posteriormente, en los estadios juveniles y adultos, se observan las c3lulas sat3lites (Nag y Nursal, 1972; Koumans *et al.*, 1990; Veggetti *et al.*, 1990). Los estudios sobre c3lulas miosat3lites en tele3steos son escasos (Powell *et al.*, 1989; Koumans *et al.*, 1990, 1991), pero en el pez, esas c3lulas probablemente contribuyen a adicionar n3cleos a las fibras en crecimiento (hipertrofia), adem3s de dar lugar directamente a nuevas fibras (Nag y Nursal, 1972; Rowleron *et al.*, 1985, Koumans *et al.*, 1990; Veggetti *et al.*, 1990). En *D. labrax*, se han observado c3lulas sat3lites enclaustradas dentro de la l3mina basal de las fibras musculares a los 40-65 d3as (13-20 mm. de longitud) (Veggetti *et al.*, 1990; L3pez-Albors, 1994).

Estudios en vivo sobre el comportamiento de los mioblastos durante el crecimiento de las ratas (Shultz, 1996), sugieren que las células satélites pueden ser divididas en 2 categorías: aproximadamente el 80% de las células satélites se dividían con un ciclo celular de 32 horas, mientras que el 20% restante se dividía más lentamente, constituyendo células de reserva. Se ha sugerido que esas células de reserva se corresponden con las células precursoras capaces de generar mionúcleos mediante divisiones asimétricas, para generar una rápida proliferación de células productoras dirigidas a diferenciarse, así como un reemplazamiento de células precursoras.

Por otro lado, Koumans *et al.* (1994) estudiaron los núcleos de células miosatélites de los músculos rojo y blanco de *C. carpio* a lo largo de su desarrollo, y encontraron evidencias indirectas que indicaban que las células miosatélites pueden no ser la única fuente de núcleos para las fibras musculares durante el crecimiento hipertrófico. Dichos autores encontraron en *C. carpio*, células semejantes ultraestructuralmente a las células satélites, situadas fuera de la lámina basal. Esas observaciones sugieren que, al menos en los teleósteos, pueden existir células miogénicas situadas fuera de la lámina basal, involucradas también en el aporte de núcleos para el crecimiento hipertrófico.

En algunos mugílidos, las fibras pequeñas del mosaico del músculo blanco, son histoquímica y electroforéticamente idénticas a las más grandes. Como esos peces también muestran una escasez (o a menudo ausencia) de células miosatélites, el “splitting” (rajamiento) de las fibras adultas podría ser un mecanismo de hiperplasia del músculo blanco en esos peces (Scapolo *et al.*, 1984; Romanello *et al.*, 1987). No obstante, aunque el rajamiento pueda ser el mecanismo de formación de nuevas fibras musculares en algunas especies de peces, esto no aporta solución al problema del origen de los núcleos fibrilares musculares adicionales en la hipertrofia casi continua de las fibras del músculo blanco, por lo que otras células no satélites pueden estar presentes, tal y como evidenciaron Koumans *et al.* (1994).

A pesar de todas las posibilidades apuntadas, actualmente la mayoría de investigadores consideran a las células miosatélites como la principal fuente de células implicadas en la hiperplasia muscular después de la eclosión.

La Fig. 2 muestra un posible modelo de mecanismo que explica la base celular por la que tiene lugar el crecimiento muscular de los peces (Johnston, 1999). Las células precursoras musculares pueden estar en fase de reposo celular (Go) o activadas. Estas últimas experimentan divisiones asimétricas que permiten, por un lado, regenerar las

células precursoras originales, y por otro, dar lugar a las “células productoras”. Las células productoras son mioblastos en proliferación determinados a diferenciarse. Estas células realizan un número limitado de divisiones, que está controlado por un balance entre señales de proliferación y de diferenciación. Estos mioblastos son absorbidos por las fibras musculares existentes para mantener la ratio núcleo/citoplasma a un nivel relativamente constante durante el crecimiento hipertrófico, o bien, se fusionan sobre la superficie de fibras existentes formando un miotubo que evoluciona hacia la formación de nuevas fibras musculares. Se desconoce si hay líneas de mioblastos responsables del crecimiento hipertrófico y de la hiperplasia fibrilar, o si se trata de una población simple de mioblastos, que está bajo el control de señales locales procedentes de fibras musculares que rodean los tejidos.

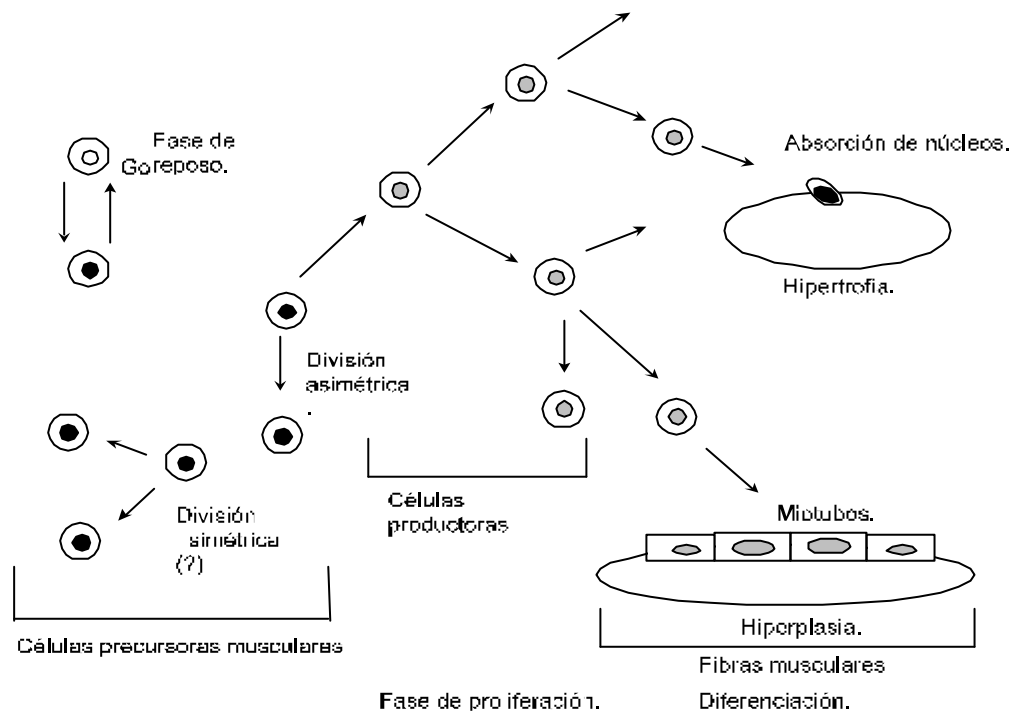


Fig. 2. Base celular por la que tiene lugar el crecimiento muscular de los peces (Johnston, 1999).

En base a este modelo, Johnston (1999) propone algunas explicaciones por las que el crecimiento muscular podría ser regulado bajo diferentes regímenes de alimentación o condiciones medioambientales, que podrían actuar modificando la duración del ciclo celular de las células productoras y/o el número de divisiones de las células productoras

antes de su diferenciación terminal, alterando el balance entre señales de proliferación y diferenciación.

De este modo, la identidad de los mioblastos de desarrollo tardío, no está generalmente establecida, tal y como han propuesto otros autores (Hoh y Hughes, 1988; Hughes y Blau, 1992), sino que puede verse influida por diversos factores. Así, factores externos como la temperatura, luz, niveles de oxígeno, la alimentación y la natación pueden interactuar con el genotipo, provocando variaciones en la tasa de crecimiento muscular (Johnston, 1999).

II-2.2.2. CÉLULAS EXTERNAS.

En embriones de *B. rerio*, Waterman (1969) observó unas células a modo de un epitelio, que cubría la monocapa de las fibras superficiales, pero a la eclosión estas células ya no estaban presentes. Waterman (1969) considera que esas células participan principalmente en la constitución del dermomiótomo del somito, aunque no excluye que puedan contribuir a formar el músculo rojo superficial. En el embrión de *C. harengus*, Johnston (1993) observó también una capa de células externas situada bajo la piel, que desaparecía a la eclosión. Dada la ausencia de filamentos contráctiles, Johnston (1993) no considera a estas células como fuente de fibras superficiales. Otros autores (López-Albors *et al.*, 1998) estudiaron las células externas en larvas de *S. aurata* y *D. labrax*, y encontraron que éstas, además de no contener miofilamentos, están orientadas verticalmente con respecto al eje longitudinal de las fibras rojas y blancas y no exhiben actividad mitótica, por lo que consideraron que no están implicadas en el crecimiento del miótomo.

Sin embargo, Veggetti *et al.* (1990) y Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995) consideran que las células externas, observadas sobre la monocapa de fibras rojas de larvas de *D. labrax* y *S. aurata*, se diferencian en mioblastos, los cuales contribuirán a la formación de las fibras musculares rojas.

II-2.2.3. TIPOS DE FIBRAS A LA ECLOSIÓN.

El desarrollo de la musculatura lateral está directamente relacionado con los tipos de fibras que integran el miotomo a la eclosión.

Se ha observado una gran diversidad en los patrones de desarrollo fibrilar del miotomo a la eclosión. Esto parece estar relacionado con el tamaño, madurez y capacidad locomotora de la larva en este momento (Waterman, 1969; Van Raamsdonk *et al.*, 1978; Veggetti *et al.*, 1990). No obstante, en general, en el embrión y en la larva con saco vitelino, se desarrollan dos zonas musculares: músculo interno blanco y músculo superficial rojo (Waterman, 1969; Nag y Nursall, 1972).

En *B. rerio* y otros ciprínidos (Talesara y Urfi, 1987; El-Fiky y Wieser, 1988), *C. harengus* (Batty, 1984), y *P. reticulata* (Veggetti *et al.*, 1993), ambas zonas están bien desarrolladas a la eclosión. En *O. mykiss* (Nag y Nursall, 1972) y *S. trutta* (Proctor *et al.*, 1980) el músculo blanco interno está bien desarrollado, pero la capa roja superficial todavía posee células miogénicas indiferenciadas.

La solla, *Pleuronectes platessa* L., que eclosiona con 6.5-7.8mm. contiene una capa simple de fibras superficiales de pequeño diámetro rodeando una masa interna de fibras de mayor diámetro (Brooks y Johnston, 1993). Ambos tipos fibrilares contienen miofibrillas maduras y un retículo sarcoplásmico extenso. Sin embargo, en larvas de pargo, *Pagrus major*, que eclosionan con 2.1mm., los miotomos contienen una capa de mioblastos indiferenciados cubriendo las fibras musculares internas (Matsuoka y Iwai, 1984). La capa superficial de mioblastos sólo se diferencia y comienza a sintetizar miofibrillas cuando la larva alcanza 2.9 mm.

Los miotomos de la anchoa del norte, *Engraulis mordax* L., contienen dos capas de fibras musculares oblicuas a la eclosión, y las fibras musculares internas y superficiales no se diferencian hasta que alcanzan una longitud de 35-40mm. y 67mm. respectivamente (O'Connell, 1981). Sin embargo, la diferenciación muscular del salmón Atlántico, *Salmo salar*, es muy avanzada a la eclosión, que tiene lugar con 35mm., después de 90 días a 2 °C, y con las agallas relativamente bien desarrolladas (Brooks y Johnston, 1993).

D. labrax eclosiona con 3mm., y la miofibrillogénesis está incompleta todavía en las fibras blancas (Veggetti *et al.*, 1990). Por su parte, las fibras rojas sólo están diferenciadas a nivel del septo horizontal. Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995) y López-Albors *et al.* (1998) encontraron en *D. labrax* y *S. aurata* a la eclosión, dos tipos de fibras diferenciables: unas formaban la capa superficial y otras el músculo blanco interno. En *S.*

aurata, Mascarello *et al.* (1995) observaron que, a la eclosión, la capa interna estaba formada por varias capas de fibras cerca de la apertura anal, siendo progresivamente más delgada, desapareciendo completamente en el miotomo más caudal, que parece contener sólo una monocapa superficial completa.

La densidad de volumen mitocondrial y miofibrilar de las fibras a la eclosión también varía ampliamente entre especies. En larvas de *P. platessa* recién eclosionadas (Brooks y Johnston, 1993), la densidad de volumen mitocondrial de las fibras superficiales e internas fue menor que en *C. harengus* en las mismas condiciones de temperatura (Vieira y Johnston, 1992). Esto fue atribuido al mayor nivel de actividad natatoria espontánea de la larva de *C. harengus* frente a la larva de *P. platessa* que, inicialmente es menos activa pasando largos períodos flotando sin moverse en la columna de agua (Brooks y Johnston, 1993).

II-2.2.4. MECANISMOS DE CRECIMIENTO LARVARIO: HIPERTROFIA, HIPERPLASIA Y ZONAS DE PROLIFERACIÓN DE MIOBLASTOS.

El crecimiento muscular tiene lugar por hipertrofia e hiperplasia fibrilares. La intensidad y/o alternancia de ambos mecanismos varía a lo largo del desarrollo larvario, en función de diversos aspectos, tales como las particularidades de cada especie, la alimentación y la interrelación de factores externos, como la temperatura, fotoperíodo, etc. Se exponen a continuación algunos de los resultados hallados sobre la dinámica de crecimiento de diversas especies de teleósteos, a lo largo de su etapa larvaria.

Durante la fase prelarvaria de *P. major* (Matsuoka, 1984), el número de fibras blancas permanecía constante, pero su área transversal fibrilar aumentó gradualmente. De igual forma, al comienzo de la fase larvaria de *C. harengus* (Johnston, 1993; Johnston *et al.*, 1995, 1998) y el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (L.), (Gibson y Johnston, 1995), el músculo blanco interno crece por hipertrofia de las fibras existentes.

En *D. labrax* recién eclosionada (Veggetti *et al.*, 1990) se observan agrupaciones de mioblastos en los extremos epi e hipoaxiales. A los 10 días aumenta el diámetro y la madurez de las fibras presentes a la eclosión y se aprecia un aumento de la hiperplasia fibrilar en los extremos apicales del miotomo. En *P. platessa* dichas zonas germinales aparecen en larvas de una semana (Brooks y Johnston, 1993). En *P. reticulata* el

crecimiento tiene lugar tanto por hipertrofia como por hiperplasia fibrilares desde los 3 a los 10 días (Veggetti *et al.*, 1993).

En *S. salar*, Nathanailides *et al.* (1995a) encontraron que el crecimiento inicial desde la eclosión al inicio de la alimentación fue principalmente debido a la hipertrofia. Sin embargo, Johnston y Mclay (1997) encontraron en esta especie una gran generación de fibras en este período. En *S. aurata* recién eclosionada, Rowleron *et al.* (1995) hallaron un bajo porcentaje de fibras de pequeño diámetro ($<5\mu\text{m}$) en el músculo blanco. Tras la primera semana de vida, dichos ejemplares de *S. aurata* presentaron una hipertrofia gradual de sus fibras y una intensa hiperplasia.

Por tanto, tras la eclosión, la hiperplasia fibrilar se inicia en diferentes momentos según la especie, y, en general, juega un papel más importante en especies que alcanzan un mayor tamaño de adulto, fundamentalmente en las fases de rápido crecimiento (Weatherley *et al.*, 1979; Carpenne y Veggetti, 1981; Romanello *et al.*, 1987). Por el contrario, en especies de pequeño tamaño, como *P. reticulata*, la hiperplasia está restringida sólo a los períodos perinatales.

Las fibras de nueva generación observadas en las diferentes especies se originan inicialmente a partir de mioblastos situados en los extremos epi- e hipoaxiales del miotomo y en el septo horizontal (aunque en especies como *P. reticulata*, la hiperplasia queda confinada sólo en los extremos epi e hipoaxiales).

Progresivamente, las células miogénicas del septo horizontal se extienden hasta las zonas apicales a lo largo de la estrecha zona situada en el límite entre los músculos blanco y rojo. Dichas células, situadas bajo la monocapa superficial, parecen transformarse en fibras blancas durante la fase larvaria, tal como ha sido sugerido en *D. labrax* (Veggetti *et al.*, 1990) y *S. aurata* (Rowleron *et al.*, 1995). Por su parte, López-Albors *et al.* (1998), encontraron en ambas especies (*D. labrax* y *S. aurata*) que, en la periferia del miotomo y en los septos horizontal y transversal, las células miogénicas (presuntivos mioblastos y mioblastos) parecían estar asociadas con la presencia de los tejidos nervioso y conectivo (mesénquima). Los presuntivos mioblastos estaban situados en la parte exterior del miotomo, mientras la madurez y el diámetro de los mioblastos se incrementaba progresivamente hacia la parte más interna del miotomo. Estos resultados complementan el modelo aposicional del crecimiento hiperplásico propuesto por Rowleron *et al.* (1995) y Stoiber y Sängler (1996), que ocurre en los primeros estadios larvarios (hasta las 4 semanas en *S. aurata* y *D. labrax*).

Posteriormente, la activación de las células miosatélites será el mecanismo responsable del crecimiento hiperplásico e hipertrófico (Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990; López-Albors *et al.*, 1998): el primero por producción de nuevos mioblastos entremezclados entre las fibras musculares adultas; y el último por aporte de nuevos núcleos a ellas. La aparición de fibras pequeñas junto a fibras grandes a través del espesor del miotomo es lo que confiere la apariencia de mosaico al músculo blanco.

En la fase postlarvaria, la zona proliferativa observada bajo la monocapa de músculo rojo de *S. aurata* comienza a producir fibras lentas en su cara superficial (Rowlerson *et al.*, 1995). En *D. labrax*, Scapolo *et al.* (1988) y Veggetti *et al.* (1990) sugieren que dichas fibras pueden dar lugar a las fibras rosas tras la metamorfosis larvaria, tal como se ha propuesto en *B. rerio* (Waterman, 1969; Van Raamsdonk *et al.*, 1982).

II-2.2.5. TRANSICIONES MIOSÍNICAS DURANTE EL DESARROLLO DE LAS FIBRAS MUSCULARES. PROPIEDADES INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Tal y como ha sido demostrado, existen diferentes isoformas de miosina que pueden ser identificadas por su perfil histoquímico y su reactividad frente a anticuerpos específicos (Mascarello *et al.*, 1984; Rowlerson *et al.*, 1985; Scapolo y Rowlerson, 1987).

La miogénesis ocurre en dos estadios principales, y las fibras producidas muestran secuencias características de expresión de cada isoforma miosínica durante el curso de su desarrollo (Narusawa *et al.*, 1987; Stockdale y Miller, 1987; Hoh, 1991; Page *et al.*, 1992; Stockdale, 1992; Hughes *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1993). Así, en el músculo esquelético de **vertebrados superiores**, las isoformas de miosina que caracterizan los diferentes tipos fibrilares en el músculo adulto son precedidas por isoformas propias del desarrollo (embrionaria y fetal/neonatal/perinatal), que pueden ser identificadas bioquímica e inmunohistoquímicamente (Whalen *et al.*, 1981; Bandmann *et al.*, 1982; Crow y Stockdale, 1986; Weydert, 1988). En los **teleósteos** la expresión de isoformas adultas de miosina en los músculos rojo, rosa y blanco son precedidas igualmente por isoformas “embrionarias y larvarias” durante el desarrollo (Van Raamsdonk *et al.*, 1978; Scapolo *et al.*, 1988; Martínez *et al.*, 1991; Focant *et al.*, 1992; Crockford y Johnston, 1993; Veggetti *et al.*, 1993; Johnston, 1994; Johnston y Horne, 1994).

Las propiedades mecánicas de las fibras musculares pueden modificarse mediante el cambio de todas o algunas de las isoformas miosínicas que presentan, dando un espectro

completo de tipos de fibras que puede abarcar desde fibras puramente rápidas a fibras puramente lentas (Crockford y Johnston, 1993). La natación va cambiando progresivamente a lo largo del desarrollo larvario, y la expresión secuencial de las isoformas de miosina específicas del desarrollo se relaciona con cambios en los requerimientos funcionales del músculo a medida que el pez crece. En *C. harengus*, la transición de tipos de fibras larvarias a adultas, coincide con el desarrollo de agallas funcionales (De Silva, 1974), y un pronunciado cambio en el comportamiento natatorio (Batty, 1984; Blaxter, 1988, citado por Kamler, 1992).

Scapolo *et al.* (1988), mediante la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas, estudiaron el desarrollo de la musculatura lateral en *D. labrax*: a la eclosión, los miotomos poseen fibras internas y superficiales, que se corresponden con los presuntivos músculos blanco y rojo adultos, respectivamente. Inicialmente, las fibras superficiales larvarias reaccionan frente a anticuerpos de miosina lenta y rápida, pero estos autores no lo atribuyen a la presencia simultánea de ambas isoformas de miosina, dado que dichas fibras no presentan actividad mATPásica (característica de las miosinas adultas blancas y rojas). Ellos sugieren que dichas fibras contienen un tipo de miosina (LR1), análoga a las formas embrionarias encontradas en otros músculos de vertebrados. Por otra parte, las fibras blancas a la eclosión muestran un patrón de reactividad similar al de las fibras superficiales, pero menos pronunciado, indicando esto la presencia de una isoforma de miosina diferente (L1W). A los 28 días, las fibras del músculo blanco reaccionan únicamente frente a suero de miosina rápida, lo que se corresponde con una nueva isoforma (L2W). En este estadio, las fibras rojas muestran también una transición a una nueva isoforma (L2R), que reacciona sólo frente a suero de miosina lenta, pero en este caso, dicha transición es gradual, comenzando en las fibras del septo transversal y extendiéndose posteriormente hacia los extremos epi- e hipoaxial. Finalmente, las fibras rojas (entre los 80 días y los 8 meses) y blancas (a los 20 meses) adquieren su patrón definitivo (AR y AW, respectivamente), con inmunorreactividad y actividad mATPasa típicas de los peces adultos. Las fibras rosas aparecen entre los 60-80 días y adquieren su perfil histo e inmunohistoquímico más rápidamente que las fibras blancas y rojas.

Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995) estudiaron el desarrollo larvario de la musculatura lateral en *S. aurata* y *D. labrax*, y encontraron a la eclosión dos tipos diferentes de fibras: fibras con alta actividad mATPasa (alcalino y ácidoestable), que forman el presuntivo rojo, y fibras con baja actividad mATPasa, parcialmente alcalinoestables y ácidolábiles, que constituyen el presuntivo blanco. La detección de fibras con alta actividad mATPasa en el

miotomo superficial puede corresponderse, según estos autores, a la coexpresión de una miosina rápida y lenta, o a la existencia de un tipo de miosina neonatal o embriogénica, como se describió en mamíferos (Whalen *et al.*, 1981), y como sugirieron Scapolo *et al.* (1988). A partir de los 25-30 días, Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995) detectan un aumento gradual en el número y tamaño de las fibras superficiales, especialmente a nivel del septo horizontal, para formar una capa con 3-4 estratos celulares. En adición a las fibras con alta actividad mATPasa, describen otras fibras con moderada y baja actividad mATPasa (fibras rojas adultas), lo que sugiere que hay un reemplazo de miosina embrionaria o neonatal por la definitiva miosina adulta, como se describe en mamíferos (Whalen *et al.*, 1981) y aves (Benfield *et al.*, 1983; Lowey *et al.*, 1983), y como describieron Scapolo *et al.* (1988).

Las fibras del músculo presuntivo blanco inicial halladas a la eclosión por Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995), ya presentaban las mismas características histoquímicas de las fibras blancas adultas (baja actividad mATPasa), por lo que debían poseer la miosina adulta. Este hecho contrasta con los resultados hallados por Scapolo *et al.* (1988) en el músculo blanco de *D. labrax*, el cual no presentó actividad mATPasa hasta los 20 meses. El músculo rosa de *D. labrax* y *S. aurata* (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995) fue detectado al final de la vida larvaria (60-80 días) por su actividad oxidativa (NADH).

Mascarello *et al.* (1995) estudiaron el desarrollo de la musculatura lateral en *S. aurata*, y encontraron similares resultados a los hallados por Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995) en esta especie. Así, a la eclosión distinguen sólo dos tipos de fibras: unas en la capa interna del miotomo, con una actividad mATPasa e inmunorreactividad semejante a las fibras adultas blancas rápidas; y las otras en la monocapa superficial, con diferente perfil mATPásico e inmunológico al de las fibras rojas adultas. Las fibras de la monocapa presentan fuerte alcalinoestabilidad y reacción positiva frente a suero anti miosina rápida. A los 6 días, aparecen las primeras fibras lentas en el septo horizontal, en la superficie medial de la línea lateral. Tras la fase larvaria su número es suficiente como para formar una capa muscular continua de fibras lentas, extendiéndose hacia las regiones apicales de los miotomos. En opinión de estos autores esto se debe, en parte, a la transformación de las fibras de la monocapa en fibras lentas (a los 100 días), pero principalmente, a la formación de nuevas fibras (a los 60 días). Ambos fenómenos se producen próximos a la línea lateral y también a lo largo de la superficie interna de la monocapa superficial, extendiéndose hacia los extremos del miotomo. Las primeras fibras rosas se describen a los 46 días. Así, los 3 tipos principales de fibras adultas aparecen al final de la vida larvaria, antes del

comienzo de la fase postlarvaria hiperplásica, cuando las nuevas fibras son formadas entre las fibras blancas rápidas.

López-Albors *et al.* (1998) estudiaron el perfil histoquímico de *S. aurata* y *D. labrax* y hallaron similares resultados a los encontrados por Mascarello *et al.* (1995) y Ramírez-Zarzosa *et al.* (1995). Las diferencias encontradas por López-Albors *et al.* (1998) entre *S. aurata* y *D. labrax* estuvieron relacionadas con la actividad mATPasa de las fibras rojas. En *D. labrax*, la actividad mATPasa de todas las fibras rojas cambió progresivamente de alta a baja (tras la aplicación de preincubaciones ácidas y alcalinas), al final del estadio larvario (50-60 días). En este estadio, en *S. aurata*, sólo un pequeño grupo de nuevas fibras rojas, localizadas bajo las fibras superficiales a nivel de la línea lateral, y observadas desde la eclosión, manifiesta baja actividad mATPasa. Esas fibras, progresivamente, se extienden hacia los límites epi e hipoaxiales, mientras que las fibras superficiales rojas no adoptan su perfil mATPásico adulto hasta los 120 días.

En otras especies, como *B. rerio* (Van Raamsdonk *et al.*, 1982) y *P. reticulata* (Veggetti *et al.*, 1993), de pequeño tamaño y que maduran muy pronto, el perfil inmunohistoquímico de sus fibras larvarias adquiere rápidamente las características propias de las fibras adultas.

Las diferencias observadas entre especies en la expresión de las isoformas de miosina, pueden ser atribuidas a los diferentes mecanismos de crecimiento, relacionados con el tamaño corporal (Veggetti *et al.*, 1993). En especies que alcanzan un gran tamaño, como *D. labrax*, *S. aurata*, *A. anguilla*, etc., las isoformas de miosina larvarias tardan más tiempo en transformarse, y la hiperplasia es más importante que en especies como *P. reticulata* o *B. rerio*, donde el crecimiento es fundamentalmente por hipertrofia y la madurez fibrilar es muy rápida (Benfield *et al.*, 1983; Lowey *et al.*, 1983; Veggetti *et al.*, 1993).

II-2.3. DINÁMICA DE CRECIMIENTO MUSCULAR EN LA FASE POSTLARVARIA.

En los peces que alcanzan un gran tamaño durante la fase adulta, a la fase embrionaria y larvaria del crecimiento muscular, prosigue una segunda fase de crecimiento durante el período postlarvario (Weatherley y Gill, 1981; Weatherley *et al.*, 1988).

Finalizada la metamorfosis larvaria, en el músculo blanco se generan fibras alrededor y en estrecho contacto con las fibras maduras de largo diámetro, dando al músculo una apariencia de mosaico en su sección transversal. La expresión miosínica en esas nuevas fibras muestra notables variaciones interespecíficas (Carpene y Veggetti, 1981; Rowleron *et al.*, 1985; Romanello *et al.*, 1987; Scapolo *et al.*, 1988; Rowleron, 1994), y el origen celular de esas fibras no es totalmente conocido (Koumans *et al.*, 1993b; Rowleron *et al.*, 1995).

La aparición del mosaico en el músculo blanco es consecuencia de procesos de hiperplasia y generalmente ocurre sólo en los peces que alcanzan un gran tamaño final (Weatherley *et al.*, 1980, 1988; Carpene y Veggetti, 1981; Weatherley y Gill, 1981; Stickland, 1983; Romanello *et al.*, 1987; Veggetti *et al.*, 1990; Koumans *et al.*, 1991; Rowleron *et al.*, 1995).

El perfil mATPásico y la inmunorreactividad de las fibras de pequeño diámetro del mosaico del músculo blanco (fibras de nueva generación) varían ampliamente entre especies. En *S. trutta* y *S. salar*, estas fibras no son diferentes de las fibras de gran diámetro (Rowleron *et al.*, 1985; Higgins, 1990). En *Mujil capito*, como en *S. aurata*, sólo difieren en su actividad mATPasa (Carpene y Veggetti, 1981; Rowleron *et al.*, 1985; Mascarello *et al.*, 1995), mientras que en *C. carpio*, *A. anguilla* y *D. labrax*, difieren en los perfiles mATPásicos e inmunológicos (Rowleron *et al.*, 1985; Romanello *et al.*, 1987; Scapolo *et al.*, 1988). En el músculo blanco de *S. aurata* y *D. labrax*, López-Albors *et al.* (1998) y Ramírez-Zarzosa *et al.* (1998) observaron un mosaico histoquímico formado por tres tipos fibrilares que difieren en tamaño y perfil mATPásico.

El mosaico postlarvario del músculo blanco ha sido explicado mediante dos posibles mecanismos de génesis fibrilar: la hiperplasia o generación de nuevas fibras musculares (Willemse y Van der Berg, 1978; Weatherley y Gill, 1981; Johnston, 1982; Stickland, 1983; Scapolo *et al.*, 1988; Koumans *et al.* 1994; Stoiber y Sängner, 1996), o el “splitting” o rajamiento a partir de células maduras (Willemse y Lieuwma-Noordanus, 1984; Romanello *et al.*, 1987). Ramírez-Zarzosa *et al.* (1998) observaron células miosatélites en los músculos blanco y rosa durante los estadios juvenil y adulto respectivamente, lo cual indica una fuente potencial de nuevas fibras. Estos autores consideran que las fibras con diámetro medio y moderada actividad mATPasa pueden ser una forma previa de transición a las fibras con largo diámetro y baja actividad mATPasa. Este proceso de transición fibrilar se asemeja al que tiene lugar en los mamíferos: las fibras que surgen de células miosatélites contienen isoformas de miosina embrionaria y neonatal

(Sartore *et al.*, 1982), que será gradualmente sustituida por la definitiva miosina adulta (Whalen *et al.*, 1981). Rowleron *et al.* (1985) indicaron que, en *C. carpio* y *A. anguilla*, las fibras pequeñas blancas presentaban una reacción positiva frente a sueros antimiosina rápida y antimiosina lenta, y sugirieron que el tipo de miosina presente en el músculo del pez puede ser similar a la miosina embrionaria de los mamíferos. No obstante, también podría tratarse de fibras híbridas con miosina lenta y rápida. Semejantes resultados a los encontrados en *C. carpio* y *A. anguilla* fueron obtenidos por Scapolo *et al.* (1988) en juveniles de *D. labrax*, y así, las fibras pequeñas blancas del mosaico mostraron un perfil inmunohistoquímico diferente al patrón observado en las otras fibras adultas y en las fibras larvarias. Dichas fibras pequeñas reaccionaban frente a los sueros de miosina rápida y lenta y presentaban una alta actividad mATPásica alcalino y ácidoestable. Estos autores sugirieron que estas fibras producidas en fases adultas, son derivadas de células satélites, y adquieren una isoforma de miosina característica (sW), similar a la observada en pequeñas fibras blancas de otros teleósteos (Rowleron *et al.*, 1985; Romanello *et al.*, 1987), la cual se transforma lentamente hacia el patrón adulto (AW) a medida que incrementa su diámetro.

El perfil histoquímico de las fibras rosas de los teleósteos se define normalmente al final de la vida larvaria (Scapolo *et al.*, 1988; Mascarello *et al.*, 1995; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998). En los estadios juveniles se mantiene dicho perfil, pero se observan zonas de transición histoquímica en relación con los músculos blanco y rojo. La zona próxima al músculo interno contribuye a la imagen de mosaico del músculo blanco, mientras que la que está junto al músculo rojo da la apariencia de “fibras rosas desplazadas” (*D. labrax* y *S. aurata*, López-Albors *et al.*, 1998; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998). Estas zonas de transición se consideran implicadas en el crecimiento del miotomo, mediante el aporte de nuevas fibras a los músculos rojo y blanco (López-Albors *et al.*, 1998; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998)

En los períodos juvenil y adulto de *S. aurata* (Mascarello *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998) y *D. labrax* (López-Albors *et al.*, 1988), el músculo rojo también crece por hiperplasia, mostrando apariencia de mosaico. Además de la participación de miocitosatelocitos, al músculo rojo adulto se incorporan nuevas fibras por medio de una transformación miosínica de las fibras de las “rosetas” (Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995), que participan también de esta forma en el crecimiento de este músculo (López-Albors *et al.*, 1998; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1998).

II-2.4. DINÁMICA DE CRECIMIENTO MUSCULAR EN JUVENILES Y ADULTOS.

La dinámica de crecimiento (incremento en el número y/o diámetro de las fibras) determina la capacidad de crecimiento miotomal (Weatherley y Gill, 1987), de manera que una disminución en el aporte de nuevas fibras conlleva que el crecimiento del miotomo dependa únicamente del incremento en el diámetro fibrilar. Cuando esto ocurre el crecimiento está limitado por el mayor diámetro fibrilar fisiológicamente eficiente. Esto quiere decir que el diámetro de las fibras es capaz de limitar el crecimiento muscular y con ello el máximo tamaño que es capaz de alcanzar una especie.

Parece que en el músculo blanco de las especies de mayor y más rápido crecimiento se continúan generando nuevas fibras hasta un tamaño corporal grande (aproximadamente el 70% de su tamaño final, Weatherley y Gill, 1985), mientras que en especies pequeñas o de crecimiento lento, el crecimiento del miotomo pronto llega a ser consecuencia únicamente del incremento en el diámetro de las fibras, con poca o ninguna hiperplasia (Weatherley y Gill, 1987).

En ejemplares adultos de *D. labrax*, Veggetti *et al.* (1990) observaron que la generación de fibras disminuye gradualmente, y cesa cuando el pez alcanza aproximadamente 48 cm. de longitud. En este momento, el crecimiento hipertrófico continúa, fundamentalmente en las nuevas fibras del mosaico. En juveniles de *S. aurata*, el crecimiento muscular hallado por Rowleron *et al.* (1995) fue fundamentalmente debido a hipertrofia. En juveniles y adultos de *C. carpio* la hipertrofia también es el principal mecanismo de crecimiento (Koumans *et al.*, 1993b).

Investigaciones sobre el crecimiento del músculo de los teleósteos han demostrado que la hipertrofia e hiperplasia pueden ser reguladas independientemente, y pueden competir una con otra. En *S. trutta*, Weatherley y Gill (1981) encontraron que la generación de nuevas fibras estaba directamente relacionada con el grado de crecimiento en juveniles pequeños, pero no encontraron esta relación en estadíos más avanzados. En juveniles de *S. salar* (Higgins y Thorpe, 1990), la hiperplasia fue intensa durante las fases de crecimiento rápido, mientras que la hipertrofia comenzó a ser más importante durante el crecimiento lento. No obstante, en *S. trutta*, Kiessling *et al.* (1991) encontraron que el crecimiento rápido favorecía la hipertrofia fibrilar, mientras el crecimiento lento favorecía la hiperplasia.

La expresión y regulación de los mecanismos de crecimiento hipertrófico e hiperplásico de la musculatura varían con la edad, los ciclos biológicos y las condiciones medioambientales (Romanello *et al.*, 1987; Talesara y Urfi, 1987; Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990). A este respecto, describimos a continuación los principales resultados de los estudios que evalúan la influencia de la temperatura sobre el desarrollo y crecimiento de los teleósteos.

II-3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO Y EL CRECIMIENTO MUSCULAR.

La temperatura ejerce un profundo efecto sobre el desarrollo de los peces (Blaxter y Hempel, 1963; Herzig y Winkler, 1986; Blaxter, 1988, citados por Kamler, 1992). Cada especie posee un rango óptimo para su desarrollo, incrementándose la mortalidad y las anomalías corporales a medida que la temperatura se aleja de ese rango (Polo *et al.*, 1991). En diferentes especies de teleósteos se ha demostrado que la temperatura influye en la secuencia de aparición de los caracteres externos y los órganos (Fukuhara, 1990), en el estado de desarrollo al que tiene lugar la eclosión (Herzig y Winkler, 1986), en el número de vértebras (Tanning, 1952), y también en las características estructurales y ultraestructurales de las fibras musculares (Stickland *et al.*, 1988; Vieira y Johnston, 1992).

Interacciones de la temperatura con el desarrollo proporcionan una fuente potencial de variaciones morfológicas y fisiológicas que podrían afectar la supervivencia de los estadios larvarios, y con ello, el reclutamiento de los stocks adultos (Johnston, 1993).

II-3.1. INFLUENCIA SOBRE LA ORGANOGÉNESIS (MIOGÉNESIS).

El efecto de la temperatura sobre el desarrollo muscular y la organogénesis ha sido estudiado recientemente en embriones y larvas de varios teleósteos. Estos estudios han estado centrados principalmente en *C. harengus*, y en todos ellos se observa que la temperatura tiene un pronunciado efecto sobre la tasa y grado de expresión del programa de desarrollo del embrión (Johnston *et al.*, 1995, 1996). Así, en embriones de *C. harengus*

incubados a diferentes temperaturas (comprendidas entre 5 y 15 °C, según el estudio), las bajas temperaturas retrasaron la miogénesis, mientras que a mayores temperaturas todos los órganos y tejidos corporales se desarrollaban más rápidamente (Johnston, 1993; Johnston *et al.*, 1995, 1997, 1998). A continuación detallamos los resultados y conclusiones más relevantes hallados en estos trabajos.

En huevos de *C. harengus* incubados a 5, 8 y 12 °C, Johnston (1993) observó que todos los órganos y tejidos se desarrollaban más rápidamente a altas temperaturas. El desarrollo de algunos órganos, como la notocorda, ojos e intestino, ocurrían a un punto equivalente entre la fertilización y la eclosión a todas las temperaturas; sin embargo, en los extremos de ese rango de temperaturas, el desarrollo de otros órganos y tejidos se desacoplaba, reflejando una diferente sensibilidad a la temperatura durante la organogénesis. En particular, el desarrollo de la médula espinal, pronefros, aleta pectoral y fibras musculares del miotomo se retrasaban relativamente a 5 °C, comparado con 8 y 12 °C. Resultados similares fueron hallados en esta especie por Johnston *et al.* (1995). El efecto de **“desacoplamiento” o desincronización de la organogénesis por acción de la temperatura**, ha sido también documentado en otras especies de peces (Hayes *et al.*, 1953; Fukuhara, 1990). Según dicho efecto, cambios en el tiempo relativo de organogénesis, y en concreto de la miogénesis, pueden explicar el incremento de anomalías corporales y mortalidad, observadas a temperaturas extremas, superiores o inferiores, a las óptimas de cada especie (Johnston, 1993; Johnston *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha demostrado que la temperatura de incubación puede influir en la diferenciación de los mioblastos durante un período crítico de la embriogénesis (Johnston, 1993). Esto se puso de manifiesto por la variación en el grado de diferenciación de los mioblastos presentes a la eclosión, en miotomos de larvas de *C. harengus* incubadas a distintas temperaturas. Según el autor, estos resultados muestran un mecanismo potencial que puede influir en las características de crecimiento futuro del miotomo.

Por otro lado, la temperatura también puede influir en la expresión génica de las proteínas miofibrilares, tal y como mostraron Crockford y Johnston (1993) en *C. harengus*. En ejemplares de esta especie incubados a diferentes temperaturas, dichos autores observaron, que, a la eclosión, la proporción de isoformas embrionarias de troponina T (TNT) era mayor en larvas incubadas a 5 °C que a 10 ó 15 °C. Asimismo, tras la eclosión, las isoformas embrionarias se mantenían durante más tiempo en las fibras blancas de larvas mantenidas a 5 °C. En cada estadio de desarrollo, la combinación de isoformas proteínicas de las miofibrillas dependía de la temperatura de cultivo. Esto sugiere que **la temperatura**

altera la expresión secuencial de los componentes de las miofibrillas en diferentes niveles. Sin embargo, todavía no se conocen las consecuencias de la modificación en la expresión de una determinada isoforma de miosina, sobre la capacidad locomotora de la larva (Crockford y Johnston, 1993).

Johnston *et al.* (1997) sometieron embriones de *C. harengus* a 5, 8, 12 y 15 °C y estudiaron la miogénesis y la expresión de isoformas miofibrilares embrionarias. La formación de miotubos aconteció en estadios somíticos similares a todas las temperaturas, pero la formación de miofibrillas se retrasó respecto al estadio de somita en los embriones incubados a menor temperatura. Los resultados hallados por estos autores les llevó a sugerir algunas hipótesis. En primer lugar, dado que la diferenciación muscular está determinada por la activación de una familia de factores de transcripción, como MyoD, Miogenina, Myf-5 y MRF4 (familia miogénica de proteínas), las bajas temperaturas pueden retrasar o reducir la producción de señales requeridas para activar la expresión de tales factores de transcripción, y con ello la de los genes músculoespecíficos. Adicionalmente, se puede retrasar el ensamblaje de proteínas contráctiles en miofibrillas organizadas.

Por otro lado, en este experimento se muestra también que **los efectos de la temperatura de incubación sobre el tiempo relativo de desarrollo de la musculatura embrionaria, persisten a lo largo de los estadios larvarios.** Así, aunque tras la eclosión se aumentó la temperatura en todas las larvas, la desaparición de las isoformas embrionarias de 3 proteínas musculares estudiadas (LC2, TNT y TNI) se retrasó en relación al tamaño corporal, cuando las larvas habían sido incubadas a menor temperatura. De igual forma, la innervación del músculo rojo comenzó a ser múltiple a un tamaño inversamente proporcional a la temperatura de incubación.

Según estos resultados, Johnston *et al.* (1997) concluyen que, durante el desarrollo embrionario de los teleósteos, **la temperatura influye sobre la velocidad de la organogénesis y, en concreto, sobre la expresión del programa miogénico, lo cual da lugar a variaciones fenotípicas significativas en los músculos natatorios de los estadios larvarios.** La capacidad natatoria de la larva depende de la longitud corporal y la temperatura (Batty *et al.*, 1993). El hecho de que las altas temperaturas de incubación den lugar a un mayor desarrollo del músculo a una menor longitud corporal **refleja un mecanismo potencial por medio del cual, la experiencia térmica embrionaria podría influir en la supervivencia y, con ello, en la resistencia de las poblaciones de peces (Johnston *et al.*, 1997).**

II-3.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MUSCULATURA DE LA LARVA.

En larvas sometidas a diferentes temperaturas de incubación y/o cultivo se ha observado que las células de la musculatura axial presentan respuestas diferentes, tanto entre las distintas especies de teleósteos, como entre diferentes poblaciones de una misma especie.

II-3.2.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TAMAÑO Y NÚMERO DE FIBRAS DEL MIOTOMO DURANTE LOS PRIMEROS ESTADIOS LARVARIOS.

Consideramos, en primer lugar, el efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento del miotomo a la eclosión y **primeros estadios larvarios**. La contribución relativa de la hipertrofia e hiperplasia al crecimiento muscular en las diferentes especies estudiadas, está significativamente influida por la temperatura de incubación. Destacamos a continuación, los principales resultados hallados en diferentes especies de teleósteos.

En *S. salar* incubado a diferentes temperaturas (rango comprendido entre 1.6 y 11 °C, según el estudio), se observó que los embriones incubados a mayor temperatura presentaban a la eclosión una mayor hipertrofia de las fibras blancas y una menor hiperplasia, que los incubados a menor temperatura (Stickland *et al.*, 1988; Usher *et al.*, 1994; Nathanailides *et al.*, 1995a). Sin embargo, la sección transversal del total del miotomo fue similar a todas las temperaturas en el momento de la eclosión.

Estos resultados demuestran que **la temperatura parece ejercer un efecto diferente sobre la división celular (hiperplasia) que sobre la síntesis proteica (hipertrofia) (Stickland *et al.*, 1988)**. Es importante señalar que, la tasa de desarrollo de todos los parámetros musculares estuvo incrementada a altas temperaturas (Stickland *et al.*, 1988), pero, para evaluar este efecto diferencial de la temperatura, los parámetros se midieron en el mismo estadio de desarrollo. El hecho de que la hipertrofia muscular estuviera incrementada en larvas que habían acelerado su crecimiento embrionario, acortando el tiempo necesario para eclosionar, contrasta con el hecho generalizado, que tiene lugar tras la eclosión, en que la hiperplasia es mayor en peces de rápido crecimiento (Weatherley y Gill, 1987; Higgins y Thorpe, 1990).

Por otro lado, Johnston y Mclay (1997) estudiaron la influencia de la temperatura

en 5 familias de *S. salar*, con el fin de analizar el efecto combinado de la temperatura y el genotipo. A la eclosión observaron que, tanto la hipertrofia como la hiperplasia fibrilares eran menores a 8 °C, dando lugar a una menor área transversal total del miotomo, que a temperatura ambiente (4.6 °C). Sin embargo, tras la reabsorción del saco vitelino, se igualaron las secciones transversales a todas las temperaturas, debido a un aumento en el número y área fibrilares, en los ejemplares sometidos a mayor temperatura (8 °C). **La temperatura, por tanto, tuvo un efecto diferente sobre la dinámica de crecimiento muscular en los períodos embrionario y larvario**, lo que puede ser debido a diversos factores, tal y como apuntaron Matschak y Stickland (1995). El mayor valor en el área transversal total observada en el momento de la eclosión a temperatura ambiente (4.6 °C) coincide con la tendencia general encontrada en huevos de *S. salar* incubados a bajas temperaturas, los cuales producen alevines más grandes. Por otro lado, la correlación positiva entre el crecimiento y el número de fibras observado en las diferentes familias tras la reabsorción del saco vitelino, coincide con el hecho general encontrado en peces juveniles, cuyo rápido crecimiento es asociado con la hiperplasia fibrilar (Weatherley y Gill, 1987; Higgins y Thorpe, 1990). Estos estudios en *S. salar* muestran que la reabsorción del saco vitelino conlleva un cambio en el patrón de crecimiento muscular, que supone un punto de inflexión en la dinámica de crecimiento y en el efecto de la temperatura sobre ella, respecto a estadios anteriores.

Se hallaron también diferencias entre las familias estudiadas, así como interacciones del efecto familiar con la temperatura. **Las variaciones entre familias fueron encontradas en la contribución relativa de la hipertrofia e hiperplasia fibrilares a la eclosión y al inicio de la alimentación externa, pero dichas variaciones fueron menores que las debidas al efecto de la temperatura (Johnston y Mclay, 1997).**

En *C. harengus* se ha estudiado también la influencia de la temperatura de incubación (rango comprendido entre 5 y 15 °C) sobre la musculatura a la eclosión. En esta especie se observó que, los ejemplares incubados a mayor temperatura presentaban un aumento de la hiperplasia del músculo blanco, y una menor hipertrofia que los ejemplares incubados a menor temperatura (Vieira y Johnston, 1992; Johnston *et al.*, 1995), siendo la sección transversal total similar a todas las temperaturas. Sin embargo, en otro stock de arenque, Johnston (1993) observó que las altas temperaturas aumentaban la hipertrofia de las fibras blancas, mientras que la hiperplasia era mayor en los incubados previamente a menor temperatura, que, a su vez, mostraron una menor sección transversal del miotomo.

En *P. platessa*, Brooks y Johnston (1993) encontraron que las altas temperaturas de incubación (15 °C) producían un aumento en el número y en el área de las fibras blancas a la eclosión, pero la supervivencia era menor que en los incubados a menores temperaturas (5 y 10 °C).

Gibson y Johnston (1995) incubaron embriones de *S. maximus* a 12 y 16 °C, y no encontraron diferencias en el número de fibras a la eclosión, pero el área transversal era mayor a 16 °C, merced a un aumento significativo del área de las fibras blancas.

El efecto de la temperatura de incubación sobre la hipertrofia e hiperplasia del **músculo rojo** ha sido menos estudiado en estas especies. En *S. salar*, la tendencia observada en las fibras rojas es similar a la descrita para las fibras blancas, pero en *C. harengus* se observan algunas diferencias. Los resultados hallados en estas especies son expuestos a continuación.

En embriones y larvas recién eclosionadas de *S. salar*, Usher *et al.* (1994) encontraron una disminución en el número de fibras rojas, así como un aumento de su área fibrilar cuando eran incubados a altas temperaturas. En esta misma especie, Johnston y Mclay (1997) observaron una disminución tanto del número como del área de fibras rojas a mayor temperatura de incubación, en larvas recién eclosionadas.

En *C. harengus*, Johnston (1993) observó un aumento de la hiperplasia de las fibras rojas a mayor temperatura de incubación, mientras que la hipertrofia estaba incrementada a menor temperatura. En esta misma especie, Johnston *et al.* (1995) no hallaron diferencias en el número de fibras rojas de ejemplares incubados a diferentes temperaturas, pero su área fue mayor en larvas mantenidas a menor temperatura.

La variabilidad intra e interespecífica observada, tanto en el músculo blanco como en el músculo rojo de las especies estudiadas, por efecto de la temperatura de incubación, se ha intentado explicar por diferentes autores. A continuación, se exponen las principales hipótesis recogidas a este respecto.

II-3.2.1.1. DIFERENCIAS INTRAESPECÍFICAS.

El tamaño y otros parámetros corporales de las larvas de *C. harengus* varían de acuerdo al tamaño de los huevos de la puesta (Blaxter y Hempel, 1963). Diferencias en el volumen del saco vitelino y la calidad de los huevos podrían influir potencialmente en el crecimiento y/o diferenciación y provocar algunas de las variaciones interanuales encontradas (Johnston, 1993). Las diferencias en el número de fibras entre poblaciones de una misma especie podrían ser el resultado de las interacciones entre factores medioambientales (como la temperatura) y el desarrollo, así como de las influencias genéticas (Johnston, 1993).

La variación interfamiliar observada en *S. salar* del Atlántico (Johnston y Mclay, 1997) puede deberse, como en otras especies, al tamaño y calidad del huevo, que varían entre poblaciones, y que influyen en el crecimiento y tamaño larvarios. Otros estudios en *S. salar* del Atlántico han mostrado diferencias en la supervivencia, crecimiento, y maduración de peces juveniles y adultos, atribuibles a influencias parentales e interacciones genotipo-medioambiente (Thorpe y Morgan, 1978; Hanke *et al.*, 1989; Herbinger y Newkirk, 1990; Wild *et al.*, 1994). En general, los huevos más grandes producen alevines mayores (Kazakov, 1981; Thorpe *et al.*, 1984), aunque su tamaño también se ve influenciado por la temperatura de incubación (Hamor y Garside, 1977; Petterson *et al.*, 1977; Gunnes, 1979).

En algunas especies de peces, se han descrito separaciones de las frecuencias génicas entre poblaciones, atribuidas a su diferente localización geográfica, lo que estaría correlacionado con la temperatura medioambiental (Koehn y Rasmussen, 1967; Power y Powers, 1975; Johnson, 1971, 1977). De hecho, se ha demostrado que temperaturas medioambientales diferentes pueden producir una selección genética a lo largo de varias generaciones. Esto se puede comprobar indirectamente al someter diferentes líneas genéticas ante las mismas condiciones medioambientales (Atkinson, 1996), con lo que se ponen de manifiesto las diferencias debidas a factores internos o genéticos.

Muchos enzimas musculares esqueléticos se localizan en diferentes formas alélicas (variación genética en un locus de gen simple), y diversos estudios hacen consistente la idea de que existe una ventaja selectiva en la variación alélica de esos loci de genes (Johnston *et al.*, 1982).

La relevancia de esta diversidad genética y, ante todo, su importancia en la acuicultura, no están todavía suficientemente valoradas, ya que las diferencias descritas entre stocks podrían ser debidas a un efecto adaptativo, o bien a la deriva genética.

II-3.2.1.2. DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS.

El efecto del aumento de la temperatura sobre la hipertrofia fibrilar en las larvas de *S. salar* difiere de los resultados encontrados en las larvas de *C. harengus* (Vieira y Johnston, 1992), en que la mayor temperatura aumentaba la hiperplasia de esta última. Puede ser que, en las larvas de *C. harengus*, el aprovechamiento de los nutrientes no sea un factor limitante puesto que la captura de alimento y la natación libre las efectúa inmediatamente tras la eclosión, mientras que la larva de *S. salar* presenta un período inactivo en el fondo sin comer, con lo que la síntesis proteica (hipertrofia fibrilar) podría suponer un mejor método para obtener una mayor eficiencia energética, y así incrementar el tamaño corporal (Usher *et al.*, 1994).

II-3.2.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DE LAS FIBRAS MUSCULARES DELAS LARVAS.

Existen estudios donde el aumento de la temperatura de incubación provocó una mayor densidad de volumen **miofibrilar** en las fibras del músculo blanco de larvas recién eclosionadas en *P. platessa* (Brooks y Johnston, 1993), *C. harengus* (Johnston, 1993) y *S. salar* (Stickland *et al.*, 1988; Usher *et al.*, 1994). En otra población de *C. harengus*, por el contrario, este parámetro permaneció constante (Vieira y Johnston, 1992).

Por su parte, la densidad de volumen **mitocondrial** aumentó en las fibras rojas de las larvas incubadas previamente a mayor temperatura: *P. platessa* (Brooks y Johnston, 1993) y *C. harengus* (Vieira y Johnston, 1992; Johnston, 1993).

De acuerdo con estos resultados, en las especies estudiadas, el aumento de la temperatura dio lugar a un incremento en la densidad de volumen mitocondrial de las fibras superficiales y una mayor densidad de volumen miofibrilar de las fibras blancas. En estas especies, las altas temperaturas provocan una aceleración metabólica general, que se manifiesta en el músculo rojo mediante un aumento del metabolismo oxidativo, reflejado

en un incremento de la densidad de volumen mitocondrial (Brooks y Johnston, 1993). Esto, a su vez, puede elevar la tasa metabólica y el nivel de actividad espontánea, reduciendo la energía aprovechable para el crecimiento, lo cual podría, en parte, explicar la alta mortalidad observada en larvas recién eclosionadas de *C. harengus* incubados a 15 °C (Brooks y Johnston, 1993).

La variabilidad y relevancia de los resultados estructurales y ultraestructurales, hallados en las larvas recién eclosionadas de las diferentes especies estudiadas, sugieren que **la división celular y la síntesis proteica miofibrilar son particularmente sensibles a la temperatura** (Stickland *et al.*, 1988; Vieira y Johnston, 1992; Brooks y Johnston, 1993). Además, como ya se mencionó anteriormente, las variaciones en el número de fibras y su diámetro por acción de la temperatura, podrían ser debidas a que **la síntesis proteica y la división celular tienen diferente dependencia de la temperatura** (Stickland *et al.*, 1988; Brooks y Johnston, 1993).

Los principales aspectos que resumen el efecto de la temperatura sobre larvas recién eclosionadas se recogen en la Fig. 3.

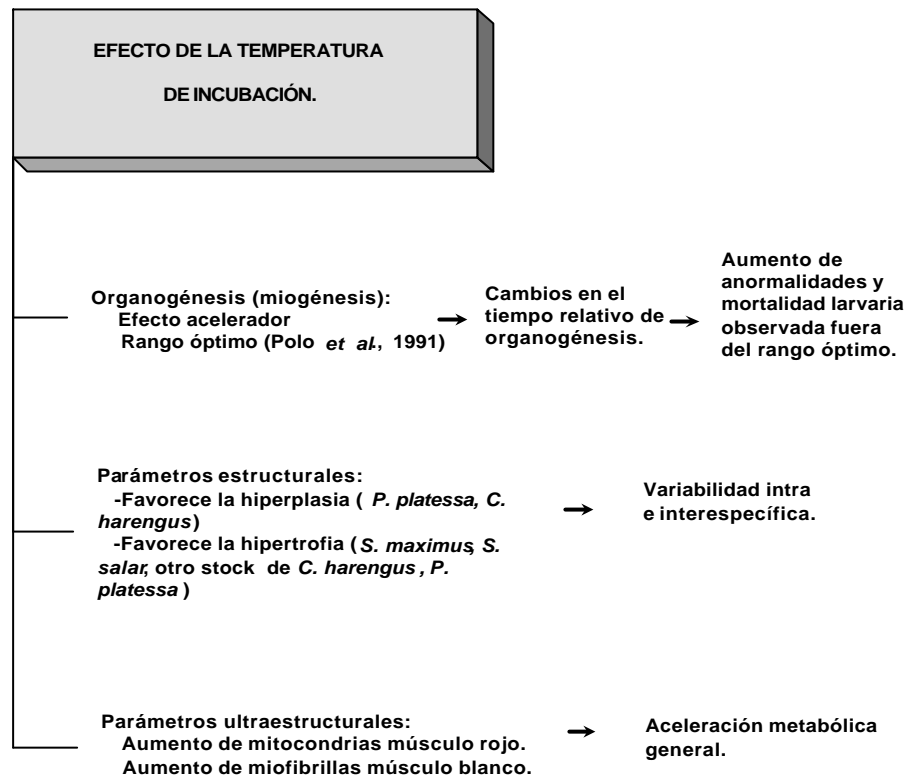


Fig. 3. Efecto de la temperatura de incubación sobre larvas recién eclosionadas.

II-3.2.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS NÚCLEOS Y CÉLULAS MIOSATÉLITES.

Los estudios sobre estos aspectos han sido realizados fundamentalmente en *S. salar*. En larvas recién eclosionadas de esta especie, incubadas a diferentes temperaturas, el número de núcleos por fibra muscular fue menor en larvas previamente incubadas a mayor temperatura, aunque el número total de núcleos en la sección del miotomo estaba incrementado (Usher *et al.*, 1994). Nathanailides *et al.* (1995a) sometieron ejemplares de esta especie a 5 y 11 °C desde la fertilización hasta las 3 semanas posteriores al inicio de la comida, encontrando que, a la eclosión el número de núcleos en el área transversal del músculo blanco era mayor a 5 °C, pero posteriormente, la densidad de núcleos fue similar a las dos temperaturas. Por otro lado, Johnston y Mclay (1997) observaron a la eclosión un menor número de mionúcleos/miotomo en larvas de *S. salar* sometidas a mayores temperaturas.

Matschak y Stickland (1995) cultivaron células satélites de *S. salar* de 7.2 cm. a 5 y 11 °C. La temperatura ejerció un pronunciado efecto sobre la fusión, diferenciación y crecimiento hipertrófico de las células satélites y miotubos. Así, observaron que las células fusionaban antes a 11 °C y su tamaño era mayor, mostrando también un incremento en el crecimiento hipertrófico de los miotubos.

En alevines de *D. labrax* sometidos a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 20-26 °C, frente a 13 °C) el número de núcleos estaba incrementado en la sección del miotomo a mayor temperatura, pero el número de núcleos por fibra no variaba (Nathanailides *et al.*, 1996). Tras 6 semanas de aclimatación, la disminución del crecimiento en ejemplares sometidos a menor temperatura fue paralela al descenso de la hiperplasia y del número de núcleos en la sección del miotomo.

Johnston *et al.* (1998) mantuvieron larvas de *C. harengus* a diferentes temperaturas hasta el comienzo de la alimentación, y las transfirieron posteriormente a una temperatura común. En el momento de la transferencia, no hubo diferencias significativas en la densidad de núcleos del total del músculo. Sin embargo, a los 80 días de la transferencia el porcentaje de núcleos a 8 °C fue considerablemente mayor que a 5 °C.

II-3.2.4. INFLUENCIA DE LA EXPERIENCIA TÉRMICA PREVIA SOBRE EL DESARROLLO CORPORAL Y EL CRECIMIENTO DE LA MUSCULATURA, A LO LARGO DE LA METAMORFOSIS LARVARIA E INICIO DE LA FASE POSTLARVARIA.

En *C. harengus* la metamorfosis larvaria va asociada a cambios en los sistemas sensoriales y de comportamiento (Batty, 1984; Blaxter, 1988; Johnston y Horne, 1994). Las fibras rojas y blancas larvarias son gradualmente reemplazadas por fibras musculares lentas y rápidas, respectivamente. Esto, a su vez, tiene lugar de forma paralela al desarrollo de las agallas y la circulación capilar (Batty, 1984; El-Fiky y Wieser, 1988). Cambios similares han sido observados en ciprínidos (El-Fiky *et al.*, 1987) y otras especies.

Johnston *et al.* (1998) estudiaron el efecto de diferentes temperaturas de incubación sobre larvas y juveniles de *C. harengus*. El crecimiento inicial tuvo lugar únicamente por hipertrofia fibrilar hasta los 12-15mm., momento en el que comenzó la hiperplasia de las fibras blancas, mientras que en las fibras rojas comenzó a los 22mm.

Para una longitud dada (18.4 mm.), no hubo diferencias significativas en el área

total del miotomo ni en el número de fibras, en ejemplares incubados a diferentes temperaturas. Sin embargo, la tasa diaria de crecimiento en longitud fue significativamente menor a 5 °C que a 8 y 12 °C, alcanzándose el final de la metamorfosis (37mm.) antes, a mayor temperatura.

Tras la metamorfosis larvaria, la sección transversal fue similar a todas las temperaturas, pero el número de fibras blancas y rojas del miotomo era significativamente mayor en los ejemplares previamente incubados a mayor temperatura. Estos autores realizaron otro experimento con larvas de esta especie, a las que mantuvieron a 5, 8 y 12 °C hasta el inicio de la primera comida, momento en el cual las transfirieron a una misma temperatura. En este caso las diferencias significativas comenzaron a detectarse a los 60-80 días de la transferencia, en cuyo momento se apreció un aumento significativo del número y área de fibras blancas, así como del área transversal del músculo blanco en los ejemplares previamente incubados a mayor temperatura. En dichos ejemplares se observó también una mayor hipertrofia del músculo rojo, un mayor número de fibras rojas en el septo horizontal y una mayor longitud corporal.

En base a estos resultados, Johnston *et al.* (1998) muestran que **la experiencia térmica durante las fases iniciales del desarrollo modula la tasa de generación de fibras y la hipertrofia en los estadios larvarios posteriores, y tales efectos pueden ser claramente diferenciables de los efectos de la temperatura sobre las fibras musculares embrionarias.** El mecanismo de modulación por el que esto tiene lugar es desconocido, pero los autores sugieren que pueden estar implicadas alteraciones en el número de células musculares precursoras y/o en el número y propiedades de los numerosos tipos celulares implicados en la regulación del crecimiento muscular. Esta hipótesis ya fue expuesta anteriormente por estos autores, para explicar el efecto de la temperatura de incubación sobre la miogénesis y el número de fibras a la eclosión (ver Fig.1). Los procesos de proliferación y de diferenciación de las células musculares precursoras son mutuamente excluyentes, y se regulan mediante un balance de señales celulares opuestas y sistemas de control múltiples y altamente redundantes. Por ejemplo, la familia MyoD de proteínas de unión al ADN y factores reguladores miogénicos (MRFs) actúan inhibiendo la proliferación y promoviendo la diferenciación celular (revisión en Olson, 1992; Rudnicki y Jaenisch, 1995).

En base a la acción de este tipo de mecanismos, **la experiencia térmica temprana podría modular potencialmente uno o más de los numerosos genes y circuitos reguladores, determinando de esta forma el número de fibras musculares y el tamaño**

miotomal de estadios posteriores (Johnston *et al.*, 1998).

Es importante resaltar que tales efectos de la experiencia térmica temprana son relativamente sutiles comparados con las grandes variaciones en la tasa de crecimiento observada entre diferentes estirpes genéticas, o como consecuencia de diferentes densidades de cultivo, niveles de ración, composiciones de la dieta, regímenes de temperatura de cultivo y fotoperíodo (Weatherley y Gill, 1987). Concretamente, algunos estudios ponen de manifiesto importantes diferencias en el número de fibras blancas entre diferentes stocks de *C. harengus*. Por ejemplo, *C. harengus* Blackwater, un stock de estuario que se desarrolla normalmente en aguas más frías que *C. harengus* Bank, presenta hasta 1.9 veces más fibras musculares al alcanzar la madurez biológica (Greer-Walker *et al.*, 1972). Aunque estas diferencias pueden ser atribuidas a diferencias genéticas, el estudio de Johnston *et al.* (1998) revela que la variación térmica puede proporcionar una explicación alternativa o adicional

El efecto de la temperatura ambiental embrionaria sobre el posterior crecimiento larvario ha sido analizado por Nathanaelides *et al.* (1995a). Dichos autores mantuvieron ejemplares de *S. salar* a diferentes temperaturas desde la fertilización hasta 3 semanas tras la primera comida. Un grupo se mantuvo a temperatura ambiente (inicialmente a 5 °C y que aumentó gradualmente a 10 °C tras la eclosión), y otro se sometió a 11 °C de manera constante. Sus resultados muestran que la temperatura de incubación puede tener un efecto significativo sobre el crecimiento larvario al menos hasta las 3 semanas tras la primera comida. Las pequeñas diferencias iniciales en el tamaño de las larvas recién eclosionadas fueron algo más aparentes al comienzo de la primera comida exógena, y se incrementaron posteriormente. Los mayores crecimientos obtenidos al final del experimento fueron hallados en los ejemplares mantenidos a temperatura ambiente, lo que fue acompañado de un número de fibras significativamente mayor que en los incubados a 11 °C. El área de las fibras también fue mayor a temperatura ambiente, aunque no de forma significativa.

En ejemplares de *S. maximus* mantenidos a 12 y 16 °C hasta 26 días tras la eclosión (Gibson y Johnston, 1995), se observó que el crecimiento muscular inicial tuvo lugar únicamente por hipertrofia hasta una misma longitud en todas las larvas, tal y como ocurrió en *C. harengus* (Johnston *et al.*, 1998). En este momento, próximo a la metamorfosis, la hiperplasia comenzó a participar significativamente en el crecimiento del miotomo siendo más notable en los cultivados a mayor temperatura, y de forma significativa. **Aunque la contribución relativa de la hipertrofia e hiperplasia al crecimiento en ambas temperaturas varía con el tiempo, esto dependió principalmente de la longitud del pez**

(Gibson y Johnston, 1995), y así, la hiperplasia comenzó a ser importante a una misma longitud a las dos temperaturas (a los 11 días a 16 °C, y a los 26 días a 12 °C), y la distribución de tamaños fibrilares (histogramas) era semejante para una longitud dada a las dos temperaturas.

En larvas de *C. carpio* cultivadas a 17 y 27 °C (Nathanailides *et al.*, 1995b), el número de fibras fue estimado a las 6 semanas. Este momento coincidió con la metamorfosis en el grupo mantenido a 17 °C, mientras que las larvas cultivadas a 27 °C habían finalizado la metamorfosis una semana antes. El número de fibras teórico fue mayor en este último grupo, pero el principal efecto de la temperatura en los estadios larvarios según estos autores, parece estar en la distribución y diferenciación de las fibras musculares, más que en la tasa de crecimiento. Esto coincide con Calvo y Johnston (1992), que obtuvieron resultados similares en *S. maximus*.

II-3.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MUSCULATURA Y COMPOSICIÓN CORPORAL EN POSTLARVAS.

El efecto de la aplicación de diferentes temperaturas en estadios postlarvarios ha sido estudiado en diversas especies. Exponemos a continuación algunas de las investigaciones que se han realizado, principalmente en *D. labrax*.

Nathanailides *et al.* (1996) sometieron alevines de *D. labrax* durante 6 semanas a dos temperaturas diferentes (temperatura ambiente: 20-26 °C, y 13 °C), y encontraron que el mayor crecimiento se daba dentro de su rango óptimo de temperatura (20-26°C), observándose un aumento en la sección transversal del miotomo a medida que se elevaba la temperatura, merced a un incremento significativo en el número de fibras del miotomo. El área de las fibras blancas no mostró variaciones significativas entre las 4 y 6 semanas en ambos grupos, aunque en los ejemplares cultivados a menor temperatura observaron una disminución de este parámetro desde las 0 a las 6 semanas.

Es sabido que la temperatura actúa sobre la toma de alimento, la actividad espontánea y el crecimiento del pez (Fry, 1971; Moksness *et al.*, 1995), y que la síntesis proteica y el crecimiento de la musculatura axial aumenta con la ingesta de alimento (Greer-Walker, 1971) y el ejercicio (Houlihan y Lauren, 1977). De acuerdo con estas

premisas, la temperatura de 20-26 °C empleada en juveniles de *D. labrax* (Nathanailides *et al.*, 1996) indujo un incremento de la ingesta y de la actividad natatoria, lo que dio lugar a una mayor tasa de crecimiento. A su vez, este fenómeno fue asociado a un aumento en el número de fibras musculares (paralelamente al del número de núcleos). Por el contrario, en los ejemplares de 6 semanas cultivados a baja temperatura, se produjo una disminución del área fibrilar, que pudo ser debida a una atrofia de fibras musculares por la reducción en la ganancia neta proteica de este grupo.

En juveniles de *C. carpio* cultivados a 25 y 5 °C (Nathanailides *et al.*, 1995b), la hiperplasia fue mayor a 25 °C. A esta temperatura, la actividad mATPásica de las fibras blancas también fue mayor que en el grupo cultivado a 5 °C, y las fibras más pequeñas del mosaico del músculo blanco mostraron actividad ácidoestable, mientras que, en peces aclimatados al frío, todas las fibras eran acidolábiles, independientemente de su tamaño. Hay algunas evidencias que llevan a sugerir que, en *C. carpio*, están presentes diferentes isoformas de miosina a temperaturas frías y calientes (Gerlach *et al.*, 1990), pero no está claro si son debidas a una isoforma distinta encontrada en las fibras blancas maduras por efecto de la temperatura caliente, o a la presencia de un mayor número de fibras pequeñas con una isoforma miosínica propia y distinta a la de las fibras blancas maduras.

Otros efectos de la temperatura ambiental en *D. labrax*, fueron observados por Alliot *et al.* (1983) y Santulli *et al.* (1993). En alevines de *D. labrax* de 50 días sometidos a 15 y 22 °C, Alliot *et al.* (1983) comprobaron que el índice de consumo (alimento seco distribuido/ganancia de peso fresco), era menor en peces sometidos a mayor temperatura. Además, en estos ejemplares se observó una mayor tasa de proteínas, un mayor contenido en cenizas y menor contenido acuoso. La eficacia en la búsqueda de alimento, el crecimiento (peso) y la actividad enzimática digestiva fue también mayor en los peces sometidos a altas temperaturas. Los peces cultivados a menor temperatura mostraron un mayor contenido en lípidos.

Santulli *et al.* (1993) mantuvieron alevines de *D. labrax* de 26 gramos a 15, 20 y 25 °C y observaron que las bajas temperaturas reducían la evacuación gástrica y aumentaban la absorción de los lípidos, mientras que las altas temperaturas (25 °C) producían el efecto contrario. Las altas temperaturas aumentaron la evacuación gástrica, lo que produjo un aumento en la frecuencia de la ingesta. Sin embargo, las bajas temperaturas disminuyeron la velocidad de tránsito intestinal aumentando la absorción.

II-3.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA MUSCULATURA EN ESPECIES ADULTAS.

En especies adultas sometidas a diferentes temperaturas, como lubina americana, *Morone saxatilis* Walbaum, (Jones y Sidell, 1982), y diferentes peces antárticos (Crockett y Sidell, 1989), se observó que, a medida que disminuía la temperatura, aumentaba el porcentaje de músculo rojo paralelamente a un mayor consumo de oxígeno y de la actividad de las enzimas aerobias. En *C. carpio*, Johnston y Maitland (1980) observaron un aumento de la densidad de volumen mitocondrial de las fibras rojas a menor temperatura, con disminución de miofibrillas en todas las fibras del miotomo. Esto podría representar una respuesta homeostática que parcialmente compensa los efectos adversos de las bajas temperaturas sobre la producción aeróbica de ATP y sobre el grado de difusión del oxígeno y metabolitos (Sidell, 1983). Los efectos sobre el contenido de mitocondrias de las fibras musculares en especies adultas, son opuestos a los descritos anteriormente en los estadios iniciales de las larvas.

En general, hay una correlación entre la magnitud de la respuesta que tiene una especie ante un cambio de temperatura y la variación de temperatura diurna o estacional encontrada en su hábitat natural (Johnston *et al.*, 1982). La respuesta inmediata ante una bajada de la temperatura del agua da lugar a un menor consumo de oxígeno debido a una disminución en la tasa metabólica. No obstante, después de un tiempo de aclimatación de varios días o semanas, la tasa metabólica a menudo aumenta a un nuevo nivel característico del estado de aclimatación al frío (Johnston *et al.*, 1982). Los mecanismos celulares por los que tiene lugar el ajuste estacional de la tasa metabólica son complejos, y se piensa que en su regulación están involucrados la expresión de componentes genéticos, la síntesis y degradación proteica, y cambios en el micromedioambiente de los sistemas enzimáticos (Shaklee *et al.*, 1977; Johnston y Maitland, 1980).

Algunos estudios han demostrado una compensación parcial en la actividad locomotora con la aclimatación a la temperatura (Griffiths y Alderdice, 1972; Smit *et al.*, 1974). Así, en el carpín dorado, *Carassius auratus* (L.), aclimatado durante varios meses a temperaturas invernales, los cambios en la actividad locomotora espontánea fueron asociados con un incremento en el porcentaje de fibras aerobias en la musculatura lateral (Johnston y Lucking, 1978; Sidell, 1980). No se sabe si esto ocurre debido a la proliferación de células miosatélites o es el resultado de una transformación de las fibras

existentes (Johnston *et al.*, 1982). Por otro lado, un aumento en la fracción de volumen fibrilar ocupado por mitocondrias, incrementaría la disponibilidad del ATP para la contracción muscular. Por el contrario, un aumento del volumen fibrilar ocupado por miofibrillas incrementaría la tensión máxima que un músculo es capaz de ejercer (Johnston *et al.*, 1982).

II-4. EFECTO DE LA INTERACCIÓN TEMPERATURA-ALIMENTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO LARVARIOS.

Incluimos este apartado en la revisión bibliográfica de este trabajo, porque permite en gran medida, entender la estrecha relación existente entre el crecimiento muscular y el desarrollo y el crecimiento de la totalidad del pez.

La influencia de la temperatura sobre el tamaño corporal (longitud y peso) y el desarrollo larvario ha sido documentada a través de diversos trabajos, los cuales ponen de manifiesto una interacción entre la temperatura y la alimentación en dicha influencia.

Inicialmente, el pez adquiere la energía del vitelo, hasta que abre la boca y es capaz de adquirir el alimento externo. La temperatura afecta al desarrollo y crecimiento larvarios, pero su influencia es diferente en cada una de las etapas del período larvario. A continuación, describimos el efecto observado en diferentes especies durante las etapas iniciales de vida larvaria.

II-4.1. PERÍODO DE ALIMENTACIÓN ENDÓGENA.

El período endógeno larvario comienza con la fertilización y finaliza con el comienzo de la alimentación exógena. Dentro de esta etapa se distinguen la **fase embrionaria** (desde la fertilización hasta la eclosión) y la **fase eleuteroembrionaria** o **prelarvaria** (desde la eclosión hasta la apertura de la boca y la reabsorción del saco vitelino).

II-4.1.1. INFLUENCIA SOBRE EL DESARROLLO.

La temperatura influye decisivamente en el desarrollo larvario durante el período vitelino de los teleósteos marinos, lo cual determina en gran medida las características de la larva cuando comienza a comer (Hunter, 1981).

Las diferentes especies de peces difieren ampliamente en la temperatura óptima para el desarrollo embrionario. Aparte de las diferencias interespecíficas, existe una gran variabilidad intraespecífica en los rangos de temperatura óptima y viable. La localización geográfica, la estación del año, los factores parentales, así como las condiciones experimentales y los diferentes criterios para definir esos rangos, pueden contribuir a esta variabilidad (Humpesch, 1985; Zhukinskij, 1986, citados por Kamler, 1992).

La **tasa de desarrollo** (inversa del tiempo necesario desde la fertilización hasta la culminación de un estadio de desarrollo concreto) está estrechamente relacionada con la temperatura: es lenta a bajas temperaturas y se incrementa con aumentos de la temperatura. El efecto acelerador de la temperatura sobre la embriogénesis, con un acortamiento del tiempo necesario para eclosionar, ha sido demostrado en muchas especies: *C. harengus* (Vieira y Johnston, 1992; Johnston *et al.*, 1995, 1997), *S. salar* del Atlántico (Stickland *et al.*, 1988; Usher *et al.*, 1994; Nathanailides *et al.*, 1995a) *P. platessa* (Brooks y Johnston, 1993) y *S. maximus* (Gibson y Johnston, 1995). En todas estas especies, las altas temperaturas también disminuyeron el tiempo de reabsorción del saco vitelino.

Los grados día (°D) necesarios para alcanzar un estadio de desarrollo dado suelen ser independientes de la temperatura. Sin embargo, en algunos casos se ha observado una disminución de los grados día ante incrementos de temperatura (Tatarko, 1965; Kokurewicz; 1970, 1971; Vovk, 1974, citados por Kamler, 1992). Por lo general, en las especies de agua fría, dentro del rango óptimo, los grados día son menos dependientes de la temperatura.

Aunque existen bastantes estudios acerca de la influencia de la temperatura de incubación sobre la tasa de desarrollo larvario (Kamler, 1992), se considera que **el comienzo de la alimentación exógena es más decisivo para la vida larvaria que el tiempo para eclosionar (Balon, 1985)**. Además, el tamaño y grado de diferenciación en el momento de la transición tienen una considerable importancia para la supervivencia larvaria (Blaxter, 1988).

Polo *et al.* (1991) sometieron ejemplares de *S. aurata* a diferentes temperaturas (entre 12 y 30 °C) desde la fertilización hasta la reabsorción del saco vitelino. Las mayores

supervivencias se obtuvieron en el rango de 16-22 °C. Fuera de ese rango, los huevos no eclosionaban, y las anormalidades corporales eran frecuentes. En otros estudios, realizados también en *S. aurata* por otros autores, se encontraron variaciones en los límites de tolerancia (Ucal, 1983, citado por Kamler, 1992; Camus y Koutsikopoulos, 1984; Divanach, 1985). En base a la tasa de eclosión y a la frecuencia de anormalidades a la eclosión, Camus y Koutsikopoulos (1984) estimaron la temperatura óptima a 14 °C. Esta temperatura difiere de la encontrada por Polo *et al.* (1991), pero en ambos casos los valores se aproximan a la temperatura a la que se mantenían los progenitores. También se han encontrado diferencias en los límites de tolerancia en otras especies, como el lenguado, *Solea solea* (L.) (Irvin, 1974) y el jurel, *Trachurus trachurus* (L.) (Pipe y Walker, 1987), lo que ha sido relacionado con la temperatura natural de desove en cada latitud. En *D. labrax*, Covès *et al.* (1991) emplean temperaturas de 15-16 °C durante el período embrionario, y posteriormente aplican un aumento gradual hasta alcanzar los 20 °C a los 20 días. Con este régimen de temperatura, dichos autores describen una tasa de supervivencia media del 50 % (35-65%) a los 45 días, y un porcentaje de peces con vejiga natatoria bien desarrollada que oscila entre el 80-100%.

II-4.1.2. INFLUENCIA SOBRE EL CRECIMIENTO.

El crecimiento embrionario se caracteriza por un incremento multiplicativo del tamaño corporal en un corto tiempo (Kamler, 1992). Sin embargo, a lo largo del desarrollo larvario hay determinadas ocasiones en las que se aprecia una disminución de la tasa de crecimiento corporal, lo que se asocia a una transición entre dos estadios de desarrollo sucesivos, y a la intensificación de los procesos de diferenciación (Kamler, 1992). Una vez finalizado cada proceso de diferenciación orgánica, se observa una aceleración del crecimiento desde el inicio del siguiente estadio de desarrollo.

El crecimiento corporal de cada especie se ve influido de diferente forma por la temperatura, observándose también una gran variabilidad intraespecífica. Describimos a continuación la tendencia observada en diversas especies.

En *S. salar* (Ryzhkov, 1976, citado por Kamler, 1992) y *S. trutta* (Zalicheva, 1981, citado por Kamler, 1992), no hubo una influencia aparente de la temperatura de incubación sobre el tamaño final a la eclosión, ni al comienzo de la alimentación en *Cottus bairdi* (Docker *et al.*, 1986, citados por Kamler, 1992), ni en el momento de la reabsorción completa del saco vitelino en *S. maximus* (Quantz, 1985, citado por Kamler, 1992).

Sin embargo, en otros estudios realizados en *S. salar* (Nathanailides *et al.*, 1995a), *C. harengus* (Vieira y Johnston, 1992), *S. maximus* (Gibson y Johnston, 1995) y *P. platessa* (Brooks y Johnston, 1993), las bajas temperaturas aumentaron el tiempo de incubación, y ello fue acompañado de una mayor longitud corporal a la eclosión. Asimismo, en larvas de *S. salar* (Hamor y Garside, 1976, 1977) y otras especies (Kamler, 1992) se ha demostrado una correlación negativa entre el peso corporal y la temperatura de incubación, hecho ya advertido por Blaxter (1969).

Por otro lado, en larvas de *Eopsetta jordani* (Alderdice y Forrester, 1971) y tenca, *Tinca tinca* (L.) (Kokurewicz, 1981, citado por Kamler, 1992) se ha observado una mayor eficiencia de conversión del saco vitelino en tejido a mayor temperatura de incubación.

En *S. trutta* (Kowalska, 1959, citado por Kamler, 1992), perca, *Perca fluviatilis* L., y lucioperca, *Stizostedion lucioperca* L. (Kokurewicz, 1969, citado por Kamler, 1992), el máximo tamaño final resultó a partir de temperaturas intermedias, lo que implica la existencia de un óptimo de temperatura.

A partir de estos resultados dispares se han propuesto tres posibles explicaciones (Kamler, 1992) (Fig. 4):

1) El período embrionario se acorta a altas temperaturas de incubación, lo que puede estar relacionado con un aumento de la movilidad embrionaria. Esto origina eclosiones precoces que, en ocasiones, van acompañadas de un menor tamaño de las larvas. También ha sido observada esta circunstancia ante temperaturas próximas al límite del rango óptimo de viabilidad, lo que genera una desincronización entre la secreción de enzimas que determinan la eclosión y el propio crecimiento de la larva.

2) Teoría “atropósica” (del griego atropos: sin retorno, sin remedio): el número de vértebras está determinado por dos procesos: diferenciación y crecimiento; que son simultáneos, pero independientes uno de otro. Cuando ha culminado un proceso de diferenciación se produce una súbita terminación del proceso de crecimiento, quedando fijado en este momento el número final de vértebras. Lindsey y Arnason (1981) propusieron este modelo para explicar la variación en el número de vértebras a la eclosión en diversas especies de peces incubadas a diferentes temperaturas. Esta teoría refleja un condicionamiento del crecimiento a la diferenciación, por lo que la acción de la temperatura sobre este último proceso puede influir indirectamente sobre el crecimiento.

3) Teoría bioenergética: el vitelo aporta una cantidad de energía predeterminada, que se reparte entre la producción de tejido y la respiración. Ambos componentes compiten entre sí por la fuente de energía endógena, con lo que un incremento del metabolismo

resultará en una disminución del crecimiento. La temperatura actúa positivamente sobre todas las tasas (tasa de desarrollo, tasa de absorción del vitelo, tasa de crecimiento y tasa metabólica), pero no necesariamente con la misma intensidad, con lo que el efecto de la temperatura sobre el crecimiento dependerá del grado de dependencia de las respectivas tasas en cada especie.

**TEORÍAS ACERCA DE LA VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA DEL
CRECIMIENTO ANTE LA TEMPERATURA.**

A) Altas temperaturas: ↑ movilidad embrionaria → Eclosiones precoces → Puede suponer una disminución del tamaño.

B) Teoría Atropésica: alcanzar el nivel crítico para el proceso de diferenciación causa una súbita terminación del proceso de crecimiento.

C) Teoría Bioenergética: el vitelo presenta una cantidad determinada de energía.

Producción de tejido ← → Respiración (metabolismo)

Un aumento del metabolismo puede resultar en una disminución del crecimiento.

Fig. 4. El esquema resume tres hipótesis que tratan de explicar la variabilidad en la respuesta que presentan las diferentes especies ante la temperatura.

Dos especies, *M. saxatilis* y *O. mykiss*, fueron incubadas a diferentes temperaturas, y se observó que la temperatura óptima para la supervivencia era más baja que la temperatura a la que se obtenían las larvas más largas, lo cual no es extraño, ya que la supervivencia y el tamaño corporal alcanzado al final de la reabsorción vitelina depende de varios procesos con diferente dependencia de la temperatura (Kamler, 1992).

II-4.1.3. INFLUENCIA SOBRE EL METABOLISMO.

Los huevos de los peces contienen una cantidad predeterminada de reservas, por las cuales compiten las demandas de crecimiento y metabolismo, tal y como se ha descrito mediante la teoría bioenergética. La eficiencia de aprovechamiento energético del vitelo en el período embrionario es aproximadamente del 84%. Tras la eclosión disminuye debido a un incremento del metabolismo, resultando una eficiencia del 55% desde la fertilización

hasta el final del período de alimentación endógena.

Durante el período de alimentación endógena no hay pérdida de energía con las heces, y el metabolismo activo es bajo, lo que permite una alta eficiencia en la conversión de la energía del saco vitelino. No obstante, la competición entre crecimiento y metabolismo por la energía del saco vitelino, conlleva variaciones en la eficiencia. El efecto de la temperatura sobre la eficiencia de conversión energética depende de su influencia sobre las tasas metabólica y de desarrollo. Así, durante el período de alimentación endógena, las grandes eficiencias se consiguen cuando las altas temperaturas aceleran más el desarrollo que la respiración.

Según los experimentos, se observa que en unas ocasiones aumenta la eficiencia con la temperatura, y en otras disminuye (Kamler, 1992). En otros casos se han observado las mayores eficiencias a temperaturas óptimas (Ryzhkov, 1976; Elliott, 1976; Brett y Groves, 1979; Winberg, 1987, citados por Kamler, 1992).

Durante el período de incubación, prevalecen unas condiciones anaerobias, pero tras la eclosión ocurre un cambio sustancial de las condiciones oxigénicas. En este momento una capa unicelular de fibras rojas (la monocapa roja) exhibe una fuerte actividad citocromo oxidasa alrededor del cuerpo de larvas de ciprínidos recién eclosionados y sirve como órgano temporal de intercambio de gas (El-Fiky *et al.*, 1987; El-Fiky y Wieser, 1988) ya que las agallas son estructuras rudimentarias en larvas recién eclosionadas.

El consumo de oxígeno fue medido en embriones a “estadios equivalentes” dentro de un rango de temperaturas. El resultado fue una curva en U, de tal manera que en los extremos del rango de temperatura, el coste metabólico de desarrollo fue mayor que en la zona intermedia. La zona de bajo coste metabólico es considerada por Ozernyuk (1985, citado por Kamler, 1992) como la temperatura óptima para el desarrollo (la mayor supervivencia de embriones se encontró por Vovk, 1974, a esas temperaturas).

La existencia de un **rango de temperaturas**, dentro del cual el metabolismo es menos dependiente de la temperatura que en los extremos, fue apuntado por Stroganov (1956, citado por Kamler, 1992) para peces, y confirmado para otros poiquiloterms (Duncan y Klekowski, 1975; Galkovskaya y Sushchenya, 1978; autores citados por Kamler, 1992) así como para larvas de 3 especies de ciprínidos (Wieser y Forstner, 1986, citados por Kamler, 1992).

El efecto de la temperatura en la tasa metabólica de poiquiloterms acuáticos ha sido objeto de numerosos estudios. El incremento del grado metabólico con el aumento de

temperatura puede ser descrito por el coeficiente de temperatura Q10 o Q1. Este coeficiente Q10 es aproximadamente 2.3 en peces (Brett y Groves, 1979), dentro del rango óptimo de cada especie.

La Fig. 5 resume algunas características del desarrollo, crecimiento y metabolismo durante el período endógeno larvario, así como el efecto de la temperatura sobre ellas.

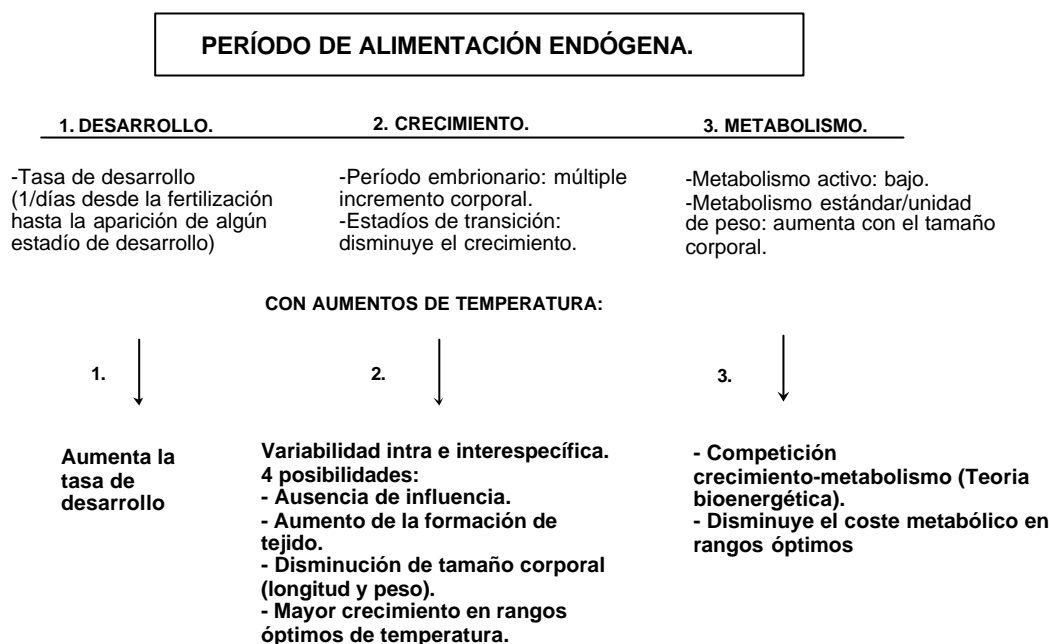


Fig. 5. El esquema representa algunas características del período endógeno larvario, así como el efecto de la temperatura sobre el desarrollo, crecimiento y metabolismo.

II-4.2. TRANSICIÓN DESDE LA ALIMENTACIÓN ENDÓGENA A LA EXTERNA (PERÍODO MIXTO DE ALIMENTACIÓN).

Es recomendable que la comida sea ofrecida a las larvas cuando adquieren la habilidad de comer, es decir, cuando empiezan a nadar y buscar comida con el saco todavía no reabsorbido (Goryczko, 1968; Jones, 1972; Elliott, 1984; Appelbaum, 1989, citados por Kamler). De esta manera, la larva aprenderá a aceptar el alimento y a procesarlo de forma progresiva.

La duración del período mixto de alimentación endógena/exógena depende de la especie y la temperatura: es más largo en especies que ponen huevos más grandes, y en larvas que se desarrollan a más baja temperatura (Kamler, 1992). La larva resiste sin comer

más tiempo a bajas temperaturas (Blaxter y Hempel, 1963; Lasker *et al.*, 1970).

El tiempo de transición de la comida endógena a exógena es reconocido como un período crítico, por la considerable vulnerabilidad de las prelarvas a diversos factores. Los principales factores que determinan la mortalidad embrionaria y larvaria pueden ser: 1) de naturaleza endógena, y 2) factores exógenos. En este último caso, se pueden clasificar en:

2.a. Bióticos: falta de comida cuando la larva inicia la alimentación externa, predación, enfermedad y parasitismo.

2.b. Abióticos: disminución del contenido de oxígeno, temperaturas extremas, pH y salinidad inadecuados, y presencia de sustancias tóxicas.

Los principales períodos críticos en el desarrollo embrionario son la división del huevo, la gastrulación y el comienzo de la organogénesis. Los defectos embrionarios transmitidos a partir de los padres, o adquiridos durante los estadios de desarrollo temprano, pueden resultar en un fracaso del desarrollo normal, y finalmente, en mortalidad que se manifiesta en los momentos críticos. Los estudios sobre este tema consideran los períodos críticos asociado primordialmente a factores endógenos. No obstante, la escasez de comida durante el período mixto ha sido reconocido como la primera causa de mortalidad entre larvas de peces.

II-4.3. PERÍODO DE ALIMENTACIÓN EXÓGENA.

El efecto de la temperatura sobre el grado de desarrollo, crecimiento y reproducción puede depender de la interrelación de diversos factores (Summerfield *et al.*, 1991; Wayne y Block, 1992, citados por Atkinson, 1996).

II-4.3.1. INFLUENCIA SOBRE EL DESARROLLO.

El desarrollo implica diferenciación de tejidos y crecimiento del organismo, por ello no puede ser separado del crecimiento del organismo (Atkinson, 1996). El rango de temperatura que permite el desarrollo es generalmente más estrecho para embriones, más ancho para larvas, y todavía más ancho para juveniles (Rombough, 1988).

Los estudios del efecto de la temperatura en el desarrollo larvario presentan la dificultad de separar el efecto de la temperatura de la influencia de la comida, que es

consumida más intensamente a mayor temperatura (Herzig y Winkler, 1985; Winberg, 1987, citados por Kamler, 1992). Es obvio que las altas temperaturas y la disponibilidad de alimento aceleran la diferenciación de estructuras morfológicas y órganos internos de las larvas, capacitándolas para atravesar más rápidamente la fase larvaria (tal y como fue observado en el bacalao, *Gadus morhua* L., por Hunt von Herbing, 1996). No obstante, todavía no existe una teoría general del efecto combinado temperatura-alimentación sobre el desarrollo larvario.

II-4.3.2. INFLUENCIA SOBRE EL CRECIMIENTO.

La tasa de crecimiento es particularmente sensible a los efectos de la temperatura, el tamaño corporal de cada especie, la calidad y la cantidad de comida. El aumento de la temperatura generalmente incrementa el crecimiento cuando los recursos son abundantes (Atkinson, 1996). Por otro lado, Brett *et al.* (1969) y Elliott (1976) mostraron en salmónidos juveniles que, ante una disminución de la ración, el óptimo de temperatura para el crecimiento disminuía.

Las interacciones existentes entre la temperatura y la calidad y disponibilidad de los recursos, tienen importantes efectos sobre la biología de cada especie, y puede explicar por qué el desarrollo suele ser más sensible a la temperatura que el crecimiento. Atkinson (1994) hizo un estudio con ectotermos sometidos a diferentes temperaturas, y mostró que un aumento de temperatura reducía el tamaño corporal a un estadio de desarrollo dado. Al acortarse el período de tiempo entre dos estadios de desarrollo consecutivos, se reduciría la cantidad total del crecimiento. Sin embargo, los efectos de la temperatura sobre el tamaño corporal de los ectotermos constituyen aún una incógnita, ya que otros autores han señalado incrementos en el tamaño corporal en respuesta al mayor desarrollo alcanzado a altas temperaturas.

II-4.3.3. INFLUENCIA SOBRE EL METABOLISMO.

Los peces, al no ser homeotermos, no gastan mucha energía en la termorregulación. Tras la fase de alimentación endógena, el metabolismo activo aumenta, lo que a su vez, se ve incrementado con la temperatura. Por otra parte, con el comienzo de la alimentación, parte del gasto metabólico se dirige a la “conversión de la comida”. La eficiencia de conversión varía con el volumen de la ración. En diferentes investigaciones se ha

observado que raciones altas de comida disminuyen la eficacia de la conversión en peces, debido a un aumento del gasto metabólico para su procesamiento. La optimización de la cantidad de comida suministrada en relación al tamaño y a la temperatura todavía permanece sin resolver para algunas larvas de peces comerciales.

La Fig. 6 muestra algunas características del período larvario de alimentación exógena, así como el efecto de la temperatura sobre éstas.

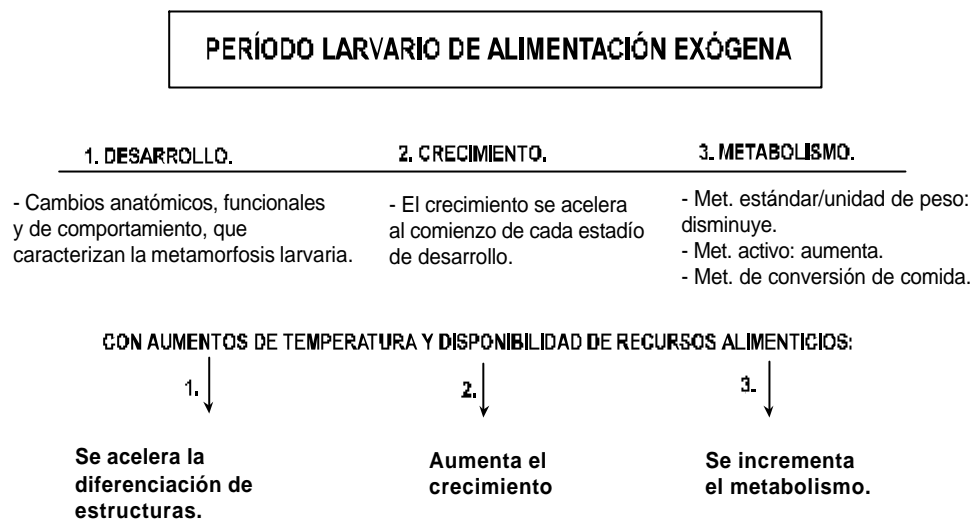


Fig. 6. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo, crecimiento y metabolismo durante el período de alimentación exógena larvaria. 1) El desarrollo implica diferenciación de tejidos y crecimiento, por ello no puede ser separado del crecimiento del organismo (Atkinson, 1996). 2) El aumento de la temperatura incrementa el crecimiento cuando los recursos son abundantes (Kamler, 1992; Atkinson, 1996). 3) Existe una competición entre el metabolismo activo y el metabolismo de conversión de comida (Priede, 1985, citado por Kamler, 1992). La optimización de la cantidad de comida respecto al tamaño corporal y la temperatura permanece sin resolver.

II-5. ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ACUÍCOLAS DE *Dicentrarchus labrax*.

D. labrax pertenece a la Familia de los Serránidos, Orden Perciformes. Es una especie típicamente mediterránea, aunque puede encontrarse en el Océano Atlántico. Posee hábitos litorales, pero suele abandonar las cercanías de la costa en su época de puesta. Son peces euritermos y eurihalinos, pudiendo soportar temperaturas que oscilan entre 5 y 30 °C, pero no se alimentan por debajo de 7 °C. Los hábitos alimenticios son carnívoros. *D. labrax* sufre la gametogénesis desde Septiembre a Enero. Más tarde, tiene lugar la puesta, abarcando los 3-4 meses siguientes, seguida de un período de reposo sexual que suele producirse en verano.

II-5.1. INTERÉS ACUÍCOLA DE *Dicentrarchus labrax*.

D. labrax es una de las especies que más interés ha despertado en el campo de la acuicultura marina, tanto por la viabilidad de su reproducción en cautividad, posterior cultivo larvario y engorde hasta talla comercial, como por su alto valor en el mercado.

En esta especie es imposible obtener alevines del medio natural con la regularidad y en la cantidad que un cultivo industrial requiere. Por este motivo, ha sido necesario poner a punto técnicas de reproducción en cautividad, desarrolladas a partir de los años 70 en España, (centro del Mar Menor del I.E.O, Ortega A. comunicación personal), y en Francia (Barnabé y Billard, 1983).

Básicamente, las investigaciones se han centrado, por un lado, en el control de la reproducción mediante fotoperíodo y temperatura, lo que ha permitido que los criaderos produzcan alevines a lo largo de casi todo el año; y, por otro, en las condiciones de cultivo como son la calidad del agua y la manipulación, alimentación y nutrición de las larvas.

II-5.2. ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL DESARROLLO LARVARIO DE *Dicentrarchus labrax*.

El período embrionario en *D. labrax* es de 112h. a 15 °C (Barnabé, 1991). La etapa larvaria de *D. labrax* dura 60-80 días, comprendiendo desde la eclosión (3.5-4 mm.) hasta el final de la metamorfosis (20-25 mm., 50-100mg).

El **desarrollo larvario** se produce en dos fases:

o FASE VITELINA.

Comprende los primeros días de vida de la larva, hasta que se produce la reabsorción del vitelo y de la gota de grasa (7-10 días). Cuando la larva aún no ha abierto la boca (5-6 días) se le denomina *prelarva*.

o METAMORFOSIS.

Finalizada la fase vitelina, la larva experimenta una serie de cambios progresivos hasta tomar la apariencia de un pez adulto (60-80 días).

A lo largo del desarrollo larvario se aprecian las siguientes etapas:

- 0-5 DÍAS.

Las larvas recién nacidas se nutren de sus reservas vitelinas (alimentación endógena). Son inactivas, flotan en la superficie del tanque y no están pigmentadas. A los 5-6 días abren la boca y ya están desarrolladas las aletas pectorales. Progresivamente adquieren la pigmentación. La prelarva manifiesta actividades motrices estereotipadas, no orientadas, por lo que el ritmo endógeno es sensible a las características del medio (como la temperatura). Este período se corresponde con la fase prelarvaria lecitotrofa (Barnabé, 1991).

- 5°-10° DÍA.

Hacia el séptimo y octavo día se termina de reabsorber la vesícula vitelina, y se produce el primer inflado de la vejiga natatoria. El glóbulo de grasa aún permanece 2-3 días más, siendo entonces la pigmentación de la larva perfectamente patente. Los ojos se hacen funcionales y comienzan las actividades orientadas. Son características del comportamiento de las larvas la fototaxia positiva (lo que asegura el mantenimiento diurno del animal en la zona superficial), la menotaxia u orientación por identificación lumínica, y la reotaxia que está asociada a la natación a contracorriente. Estas actividades orientadas permiten una verdadera prospección del medio en el momento en que las larvas son aptas para alimentarse de manera autónoma. Este período se corresponde con la fase larvaria heterótrofa (Barnabé, 1991).

- 30-35 DÍAS.

Comienza la metamorfosis, cuando la larva tiene un tamaño aproximado de 10-12 mm. Suele darse cierto canibalismo en los estanques, si no se clasifican adecuadamente, debido a la dispersión de tallas.

- 60-80 DÍAS.

Finaliza la metamorfosis, cuando el alevín mide 20-25 mm., *D. labrax* adquiere la morfología del adulto y comienza el período juvenil. En este momento aparecen las escamas.

D. labrax se adapta bastante bien al alimento inerte por lo que este cambio de alimentación no es muy problemático.

Es importante resaltar la importancia de las clasificaciones, tal y como indicamos anteriormente. *D. labrax* es un pez muy voraz, y si no se clasifican adecuadamente los ejemplares de un mismo tanque, se pueden presentar problemas de canibalismo, debido a la dispersión de tallas. Lo más usual es realizar una clasificación recién terminado el destete, coincidiendo con el final de la metamorfosis.

Entre las malformaciones que presenta esta especie destaca la hiperdilatación de la vejiga natatoria, que ocasiona la muerte de la larva por aplastamiento de los demás órganos internos. Este problema se suele presentar entre los 20 y 40 días de cultivo. Suele deberse a deficiencias nutricionales o a factores estresantes en el cultivo, tales como excesiva luz o temperatura, manejo inadecuado, etc.

D. labrax es bastante sensible a contraer infecciones bacterianas del tipo de vibriosis, sobre todo si la temperatura de cultivo es elevada. Este riesgo se acentúa al efectuar las clasificaciones porque el pez sufre descamaciones por roce, y porque el estrés causado por el manejo lo debilita y lo hace más susceptible. Es conveniente tomar medidas profilácticas del tipo de baños preventivos en formol antes y después de las clasificaciones, y en caso de que se presente la infección, se trata con antibióticos.

Otros problemas que pueden presentarse son infestaciones por parásitos, enfermedad de la burbuja, etc. Las deformaciones esqueléticas y ausencia de vejiga natatoria eran problemas muy comunes, pero las nuevas técnicas de cultivo han disminuido mucho su incidencia.

Los mejores índices de supervivencia que se obtienen durante el cultivo larvario de esta especie oscilan alrededor del 40 %.

II-5.3. FASE POSTLARVARIA.

D. labrax adquiere la morfología de adulto con una talla aproximada de 30mm. (Barnabé, 1991), aunque a veces se da muy precozmente (a una talla de 20mm.). En este momento aparecen las escamas. Estos estados se alcanzan en los meses cálidos del año, teniendo en cuenta el período en el que tiene lugar la puesta. Su crecimiento se interrumpe por las bajas temperaturas invernales. Tessyre (1979, citado por Barnabé, 1991) ha observado que, en cautividad, los juveniles de *D. labrax*, aunque continúen alimentándose,

apenas crecen cuando la temperatura es inferior a los 10 °C.

En este período *D. labrax*, hasta ahora pelágica, se vuelve demersal, y a menudo vivirá cerca del fondo. Este estadio marca una etapa fundamental desde el punto de vista eco-etológico: es en este momento cuando la especie adquiere el carácter ubicuista. Se han puesto en evidencia fenómenos de gregarismo tanto en cautividad como en el medio natural.

III.-MATERIAL Y MÉTODOS

III.-MATERIAL Y MÉTODOS

III-1. ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES EMPLEADAS.

En este trabajo se consideran dos experimentos fundamentales y una prueba experimental adicional, realizadas en el Instituto Español de Oceanografía (Centro Oceanográfico de Murcia, Planta de cultivos de Mazarrón), a partir de puestas obtenidas de progenitores de *Dicentrarchus labrax*, adaptados a la vida en cautividad.

El primer experimento se realizó con carácter preliminar, y en él se definieron unas condiciones experimentales, que consistieron básicamente en incrementar la temperatura ambiental de incubación y/o cultivo, con el fin de estudiar su efecto sobre el desarrollo y el crecimiento larvario de *D. labrax* mediterránea.

En el segundo experimento, aplicamos temperaturas de cultivo mayores a las empleadas anteriormente, y estudiamos su efecto en dos poblaciones distintas de *D. labrax*: atlántica y mediterránea; procedentes de reproductores genéticamente distintos. Este experimento se incluía en un proyecto de investigación donde se pretendía evaluar la influencia del componente genético y de la temperatura sobre la capacidad de crecimiento larvario y postlarvario de esta especie. Nuestra contribución al proyecto consistió en la valoración del efecto de la temperatura sobre el crecimiento muscular de ambas poblaciones de *D. labrax*.

Finalmente, se realizó una prueba adicional a partir de una puesta de *D. labrax* atlántica obtenida en 1998. La finalidad de esta prueba era introducir algunas modificaciones en la temperatura de incubación, y comparar sus resultados con los obtenidos en los experimentos anteriores.

A continuación, se detallan las citadas experiencias:

III-1.1. EXPERIMENTO 1° (1996).

En el primer experimento la puesta fue obtenida a principios del mes de febrero de 1996, a partir de un stock de reproductores de *D. labrax* mediterránea -60 machos y 30 hembras- que se mantenían en un tanque de 45 m³, con temperatura y fotoperíodo naturales. El criterio de selección de la puesta se fundamenta en los siguientes parámetros de calidad: flotabilidad, transparencia del huevo, esfericidad perfecta, simetría de las divisiones, y un porcentaje de fecundación mayor del 80 %. En este caso se seleccionó una puesta de aproximadamente 217000 huevos con un 94.2 % de fecundación obtenida a una temperatura de 15.4 °C. Dicha puesta se repartió en 4 lotes de aproximadamente 50000 huevos, que se colocaron en 4 tanques de cultivo larvario de 1 m³ de capacidad, cilíndricos y de fibra de vidrio, donde tuvo lugar tanto la incubación como el posterior cultivo larvario. Se utilizó el método de cultivo en oscuridad, sin alimentación hasta los $\cong 160$ °C-día, momento en que se pusieron con iluminación continua y se inició la alimentación larvaria directamente con *nauplii* de *Artemia salina*. En el día 18 de vida se cambió el fotoperíodo a 12/12 (8-20h. luz). Los valores de oxígeno disuelto se mantuvieron alrededor de 6.5mg/litro. Este experimento finalizó a los 120 días de edad. Las temperaturas de incubación utilizadas fueron aproximadamente 15 °C y 17 °C, y las de cultivo fueron la temperatura ambiental ($\cong 15$ °C) y 17 °C, de modo que los cuatro lotes experimentales estudiados fueron sometidos a las siguientes combinaciones de temperatura: 15 °C/ambiental, 15/17 °C, 17 °C/ambiental y 17/17 °C, refiriéndonos a la temperatura de incubación/temperatura de cultivo respectivamente (Fig. 7).

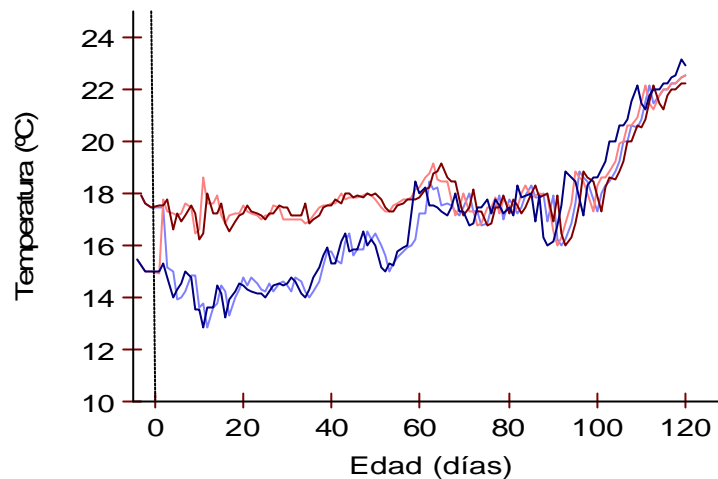


Fig. 7. Registros de temperatura: la aplicación de altas temperaturas se realizó aumentando aproximadamente 1 °C/día.

III-1.2. EXPERIMENTO 2º (1997).

En 1997, se realizó un segundo experimento, a partir de dos lotes de reproductores de *D. labrax* de distinta procedencia geográfica: atlántica (11 machos y 23 hembras) y mediterránea (60 machos y 30 hembras), que se mantuvieron en tanques de 45 m³ con temperatura y fotoperíodo naturales. La puesta de ambos stocks de reproductores tuvo lugar en el período comprendido desde el 10 de enero al 10 de marzo. En *D. labrax* atlántica se seleccionó una puesta de aproximadamente 309000 huevos, obtenida a finales de enero, con un 88 % de fecundación a una temperatura de 14.6 °C. En *D. labrax* mediterránea se empleó una puesta de aproximadamente 384000 huevos con un 89 % de fecundación, recogida a primeros de febrero, a una temperatura de 15.3 °C. Los huevos de *D. labrax* atlántica y de *D. labrax* mediterránea se distribuyeron en 4 lotes, en ambos casos, y se incubaron en tanques troncocónicos y de fibra de vidrio, con una capacidad de 0.5 m³, resultando una densidad de 50-100 huevos/litro. El cultivo larvario se realizó en tanques cilíndricos de 1m³, a una densidad de 50 larvas/litro. Se utilizó el método de cultivo en oscuridad sin alimentación hasta los 160 °C-día, momento en que se inició la alimentación larvaria directamente con *nauplii* de *Artemia salina*, siguiendo la misma metodología que en el primer experimento. Este experimento finalizó a los 90 días de edad. Las combinaciones de temperatura incubación/cultivo aplicadas fueron (Fig. 8): en *D. labrax* atlántica 14.6 °C/ambiental, 16.6 °C/ambiental, 14.6/19 °C y 16.6/19 °C; y en *D. labrax* mediterránea 15.3 °C/ambiental, 17.3 °C/ambiental, 15.3/19 °C y 17.3/19 °C. Los

valores de estas temperaturas presentaron ligeras oscilaciones (± 0.5 °C), por lo que, a efectos prácticos, al referirnos a las temperaturas aplicadas en ambas poblaciones, lo haremos de la siguiente forma: 15 °C/ambiente, 17 °C/ambiente, 15/19 °C y 17/19 °C. Se hicieron 2 réplicas de cada uno de los lotes, por lo que el total de tanques experimentales fue de 8 en cada una de las poblaciones de *D. labrax* (atlántica y mediterránea). La finalidad de duplicar los tanques fue garantizar el aprovisionamiento de ejemplares, previniendo así posibles contratiempos; y aumentar la fiabilidad de los datos medidos al disponer de un mayor tamaño de muestra, dada la gran variabilidad y heterogeneidad que suelen presentar los ejemplares de esta especie.

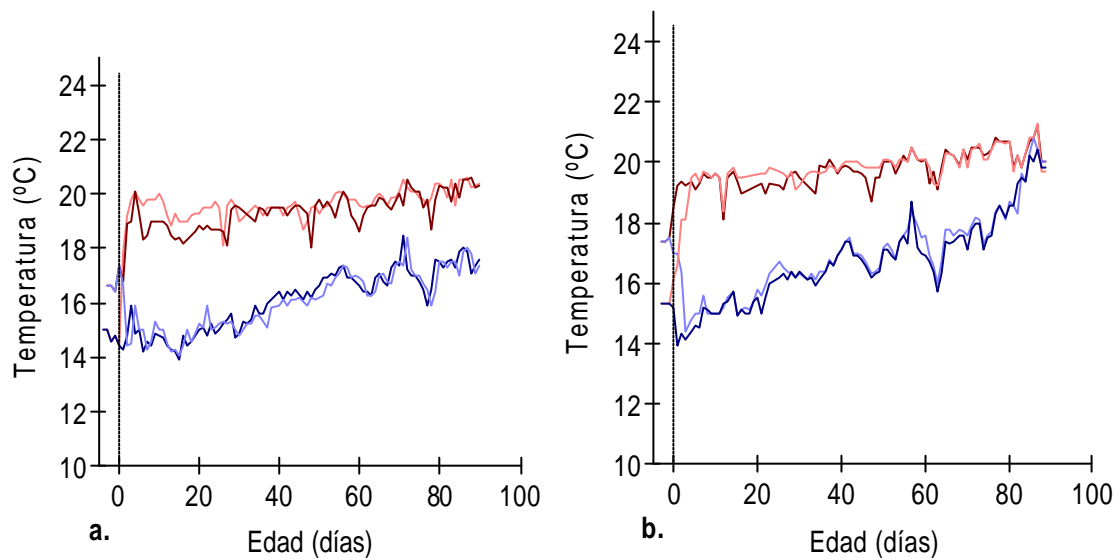


Fig. 8 (a,b). Temperaturas aplicadas sobre larvas de *D. labrax* atlántica (a) y mediterránea (b). La aplicación de altas temperaturas se realizó aumentando 1 °C/día.

III-1.2.1. ANÁLISIS GENÉTICO.

El análisis genético de los reproductores fue realizado por el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, que constituye uno de los grupos de investigación que participaron en la realización del proyecto llevado a cabo en 1997 (experimento 2º). Los resultados hallados fueron cedidos por los investigadores responsables para la elaboración del informe final del citado proyecto. Se resumen, a continuación, los aspectos más importantes.

Todos los reproductores atlánticos y mediterráneos que habían sido marcados previamente con un sistema electrónico “pit-tag” fueron anestesiados, pesados y medidos, y se les extrajo una muestra de sangre para el análisis de ADN.

El objetivo del análisis genético perseguía valorar el grado de diferenciación genética existente entre los dos lotes de reproductores empleados en el proyecto: Atlántico (A) y Mediterráneo (M), así como estimar posibles efectos de deriva genética en la descendencia (F1), ocasionada por un “tamaño efectivo pequeño”, o lo que es lo mismo, por la participación de un número reducido de progenitores.

La primera parte del objetivo se llevó a cabo analizando la variabilidad de dos loci de microsatélites D1a 6 y D1a 11, desarrollados para *D. labrax* por Castillo y Mc Andrew¹ (1998). Para ello, se hizo extracción del ADN de muestras de sangre procedente de 79 individuos reproductores del stock (M) y 61 del stock (A). Se intentaron otros dos loci microsatélites, pero la resolución no fue suficiente como para generar información fiable. No obstante, el alto número de alelos detectados a partir de D1a 6 (11) y de D1a 11 (14) permitía la obtención de parámetros fiables de variabilidad genética y diferenciación entre ambos stocks.

Los parámetros de estructura genética y de diferenciación de ambos stocks se calcularon con los programas GENEPOP GENETIX².

Los resultados obtenidos en las frecuencias genotípicas, indican que ambos cumplen las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg, $p=0.772$ para (A) y $p=0.190$ para (M), con lo cual se esperaría que, en ausencia de efecto de deriva genética, las frecuencias alélicas de equilibrio se tendrían que mantener en la descendencia. Sin embargo, este último aspecto no pudo ser probado ya que hubo una alta mortandad en la F1 de algunos lotes, y no se pudieron analizar muestras representativas de la progenie.

El estadístico empleado para valorar el grado de diferenciación genética entre ambas muestras fue el F_{st} , cuyo valor ($F_{st}=0.091$) tras ser sometido a un test de significación, indica que la probabilidad de que ambos stocks sean diferentes es del 97%. Otro parámetro, el Test de diferenciación, corrobora estos datos.

Estos resultados sugieren que en base a los marcadores utilizados, el stock (A) y el (M) deben ser considerados genéticamente diferentes.

¹Castillo R. and B. Mc. Andrew, 1998. Two polymorphic microsatellite markers in the european seabass, *Dicentrarchus labrax* (L). *Animal Genetics*, 29 (2):151.

²Raymond M. and F. Rousset, 1995. GENEPOP (1.2.) population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86: 248-249.

Belkhir K., P. Borsa, J. Boudet and F. Bonhomme, 1996. GENETIX, logiciel sous Windows pour la genetique des populations. Laboratoire Genome et populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier.

III-1.3. EXPERIMENTO 3º (1998).

Finalmente se realizó una prueba adicional complementaria en 1998. En esta prueba se empleó una puesta de aproximadamente 126000 huevos de progenitores de *D. labrax* atlántica, obtenida en similares condiciones a las indicadas anteriormente; y se distribuyó en dos lotes que fueron sometidos respectivamente a 19/19 °C y a 19 °C/ambiental (Fig. 9), siguiendo la metodología descrita en los otros experimentos. Esta prueba finalizó a los 40 días.

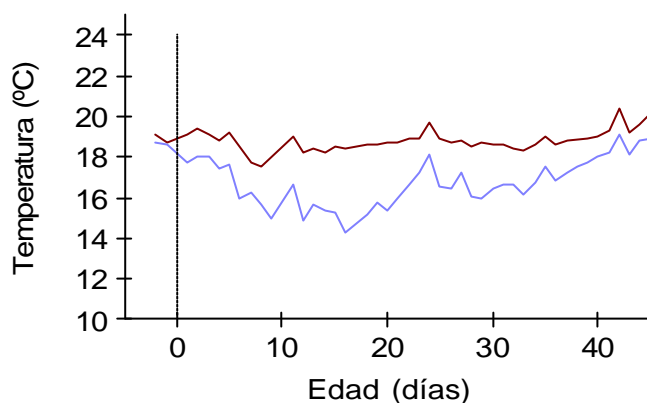


Fig. 9: Registros de temperatura: la aplicación de altas temperaturas se realizó aumentando aproximadamente 1 °C/día

La tabla 1 muestra las combinaciones de T^aincubación/T^acultivo utilizadas en todos los experimentos incluidos en este trabajo:

Tabla 1.

Experimento 1º (1996) <i>D. labrax</i> mediterránea	Experimento 2º (1997) <i>D. labrax</i> atlántica y mediterránea	Experimento 3º (1998) <i>D. labrax</i> atlántica
15 °C/ambiente	15 °C/ambiente	19 °C/ambiente
17 °C/ambiente	17 °C/ambiente	19/19 °C
15/17 °C	15/19 °C	
17/17 °C	17/19 °C	

III-2. TOMA DE MUESTRAS.

Las muestras se tomaron en distintos momentos del desarrollo larvario y en la fase postlarvaria. Cada uno de los puntos de toma de muestras se definió en función de la culminación de algún estadio de desarrollo característico (“hecho biológico”) o de acuerdo con la pauta de alimentación (Fig. 10). En los estadios correspondientes a la eclosión, apertura de la boca y escamación, las muestras se tomaron cuando la mayoría de los ejemplares de cada tanque (alrededor del 90 %) alcanzaron este estadio. A continuación, se detalla el calendario de toma de muestras y los estadios correspondientes para cada experimento (Tablas 2-4).

Tabla 2.

Experimento 1° (1996), <i>D. labrax mediterránea</i>		
Toma de muestras (hecho biológico o nutricional)	Edad (días posteclosión)	°C-Día.
Eclosión	0 días (incubación: 2 días a 17 °C).	35.5 °C-d.
	0 días (incubación: 3 días a 15 °C).	45.4 °C-d.
Apertura de la boca	5 días (17/17 °C).	122 °C-d.
	6 días (15/17 °C).	129.6 °C-d.
	7 días (17 °C/ambiente).	157.3 °C-d.
	8 días (15 °C/ambiente).	148.4 °C-d.
Plena fase de alimentación viva con <i>nauplii</i> de <i>artemia</i>	15 días.	
Comienzo del destete (pienso de arranque)	35 días.	
Final del destete (sólo alimentación inerte)	50 días.	
Fin de la metamorfosis larvaria (escamación)	78 días (17/17 °C y 15/17 °C).	
	89 días (17 °C/ambiente).	
	110 días (15 °C/ambiente).	
Fase postlarvaria (alevines)	120 días.	

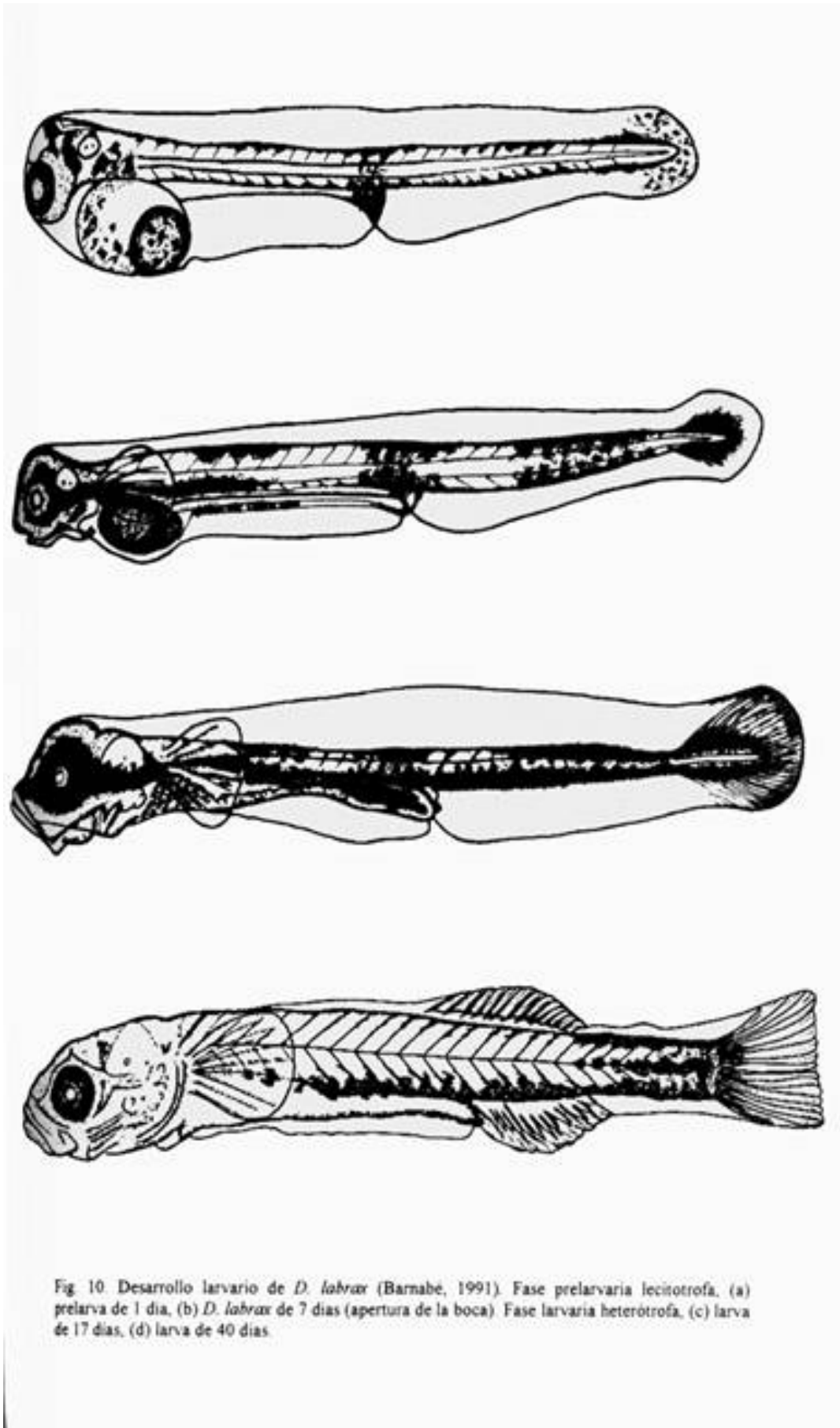


Fig. 10. Desarrollo larvario de *D. labrax* (Barnabé, 1991). Fase prelarvaria lecitotrofa, (a) prelarva de 1 día, (b) *D. labrax* de 7 días (apertura de la boca). Fase larvaria heterótrofa, (c) larva de 17 días, (d) larva de 40 días.

Tabla 3.

Experimento 2º (1997), <i>D. labrax</i> atlántica y mediterránea				
Toma de muestras (hecho biológico o nutricional)	<i>D. labrax</i> atlántica		<i>D. Labrax</i> mediterránea	
	Edad (días posteclosión)	°C-día	Edad (días posteclosión)	°C-día
Eclosión	0 d. (inc. 3d. a 17 °C)	49.6 °C-d.	0 d. (inc. 2.5d. a 17 °C)	43.5 °C-d.
	0 d. (inc. 4d. a 15 °C)	59.4 °C-d.	0 d. (inc. 3d. a 15 °C)	45.9 °C-d.
Apertura de la boca	4 d. (17/19°C).	142 °C-d.	3 d. (17/19°C).	128.6 °C-d.
	4 d. (15/19°C).	151.1 °C-d.	4 d. (15/19°C).	136.3 °C-d.
	6 d. (17°C/amb.).	158.6 °C-d.	5 d. (17°C/amb.).	146.6 °C-d.
	6 d. (15°C/amb.).	162.9 °C-d.	6 d. (15°C/amb.).	146.9 °C-d.
Alimentación viva (<i>nauplii</i> de <i>artemia</i>)	20 días.		20 días.	
Comienzo destete (pienso de arranque)	48 días.		55 días.	
Fin metamorfosis larvaria (escamación)	52 d. (15/19 °C y 17/19 °C).		52 d. (15/19 °C y 17/19 °C).	
	71 d. (15°C/amb. y 17 °C/amb.).		67 d. (17°C/amb.). 73 d. (15 °C/amb.)	
Fase postlarvaria (alevines)	90 días.		90 días.	

Tabla 4.

Experimento 3º (1998), <i>D. labrax</i> atlántica		
Toma de muestras (hecho biológico o nutricional)	Edad (días posteclosión)	°C-Día.
Eclosión	0 días (inc. 2 días).	37.8 °C-d.
Apertura de la boca	3 días (19 /19 °C). 4 días (19 °C/ambiente).	126.5 °C-d. 113.7 °C-d.
Aimentación viva (<i>nauplii</i> de <i>artemia</i>)	20 días.	
Comienzo del destete (pienso de arranque).	40 días.	

De cada estadio de toma de muestras correspondiente a cada experimento (1º, 2º, 3º), se recogieron 50-100 larvas por tanque experimental, para su análisis morfométrico. El transporte de los especímenes al laboratorio del Área de Anatomía y Embriología de la Facultad de Veterinaria de Murcia se realizó mediante contenedores de agua opacos provistos de oxigenadores. Tras un período de reposo de unos 30 minutos, los peces fueron sobreadormidos en los contenedores por adición al agua del ácido 3-aminobenzoico etil éster de la sal metanosulfonato (MS222, SIGMA), y se eligieron al azar 10 especímenes/tanque experimental para ser procesados.

Por otro lado, en el Centro Oceanográfico de Mazarrón (I.E.O) se llevó a cabo la medición de diversos parámetros corporales. Así, en el experimento 1º (1996), se tomaron muestras de la longitud corporal de forma periódica (cada 2-10 días) desde la eclosión hasta los 120 días; y se midieron los pesos corporales en el período comprendido desde los 37 a los 58 días. De la misma forma, en el experimento 2º (1997), se midió la longitud corporal desde la eclosión hasta los 90 días, y los pesos corporales se registraron desde los 40 días hasta el final del estudio. En este segundo experimento se midieron también el diámetro de los huevos a lo largo de la fase embrionaria, y la longitud del saco vitelino durante la fase vitelina, con la ayuda de una lupa binocular acoplada a un micrómetro.

Todas las medidas se realizaron a partir de 10 larvas/tanque de cultivo cada uno de los días de toma de muestras. Además, en el experimento 2° (1997) se emplearon tanques duplicados resultando un total de 16 tanques experimentales. En todos ellos se midieron los citados parámetros y el porcentaje de supervivencia final.

III-3. PROCESADO.

Comienza con la fijación de los especímenes seleccionados (la totalidad de la larva o su segmento caudal, según el tamaño) en glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1M (pH 7.2-7.4) durante 3 horas, a una temperatura de 4 °C. A continuación, el material se mantiene durante una noche en solución lavadora 0.35% de sacarosa en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.2-7.4), a la misma temperatura. El resto del procesado, detallado a continuación, se completó en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Murcia (Método de Wanson y Drochman, 1968).

III-3.1. INCLUSIÓN EN EPON.

La metodología usada fue la siguiente:

- Postfijación en ácido ósmico al 1%, 2 horas y media a 4 °C.
- Tinción en acetato de uranilo al 4.8% en tampón veronal (pH 7.2-7.4) durante 2 horas, a 4 °C.
- Deshidratación en escala ascendente de alcoholes (30%, 50%, 70%, 90% y 100%), dando un pase de 20 minutos por cada uno de ellos, y dos pases por el absoluto.
- Oxido de propileno, dos pases de 30 minutos.
- Preinclusión en mezclas de óxido de propileno y EPON (3/1, 3/2, 1/3) una hora cada una, para dejarlo posteriormente en EPON puro durante una noche a temperatura ambiente (Luft, 1961).
- Inclusión en cápsulas de EPON puro, 48 horas a 75 °C.

Se obtuvieron 10 muestras (bloques de EPON) por cada tanque experimental en cada uno de los días de toma de muestras.

III-3.2. SECCIONES.

A partir del material encapsulado en bloques de EPON, se eligieron al azar 5 especímenes en cada uno de los estadios definidos. Hemos considerado suficiente el número de 5 ejemplares, dado que en los estudios morfométricos realizados hasta ahora en músculo de peces, el número más frecuente de especímenes procesados es de 3 a 5 (Stickland *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990, 1993; Nathanailides *et al.*, 1995a; Johnston *et al.*, 1998).

Se realizaron cortes transversales semifinos de 0,5-1µm. de espesor, con un ultramicrotomo Reichert Jung modelos ultracut y ultracut-E. El punto de corte elegido fue inmediatamente caudal a la apertura anal. Las secciones semifinas fueron teñidas usando la técnica Ontell (1974).

III-3.3. TINCIÓN: Técnica de Ontell (1974).

Esta técnica tiene un elevado poder de resolución en los estudios de microscopía óptica (Fig. 11), por lo que puede ser usada para estudios descriptivos sobre los mecanismos celulares de crecimiento muscular y para la realización de estudios morfométricos relacionados. La aplicación de la técnica precisa que el material de partida se encuentre incluido en EPON o sustancia semejante, según el protocolo descrito anteriormente. La tinción requiere como condición previa la deseponización de los cortes, para que los colorantes histológicos puedan penetrar en el tejido.

III-3.3.1. DESEPONIZACIÓN.

- Poner los cortes semifinos como mínimo 1 hora en una solución saturada de hidróxido sódico en alcohol etílico absoluto. Esta solución ha de realizarse con dos o tres días de antelación para que en el momento de su utilización tenga un color marrón pajizo.
- Secar bien los portaobjetos en papel de filtro.
- Baño de los cortes durante 5 minutos en alcohol etílico absoluto.
- Repetir esta operación en alcohol nuevo.

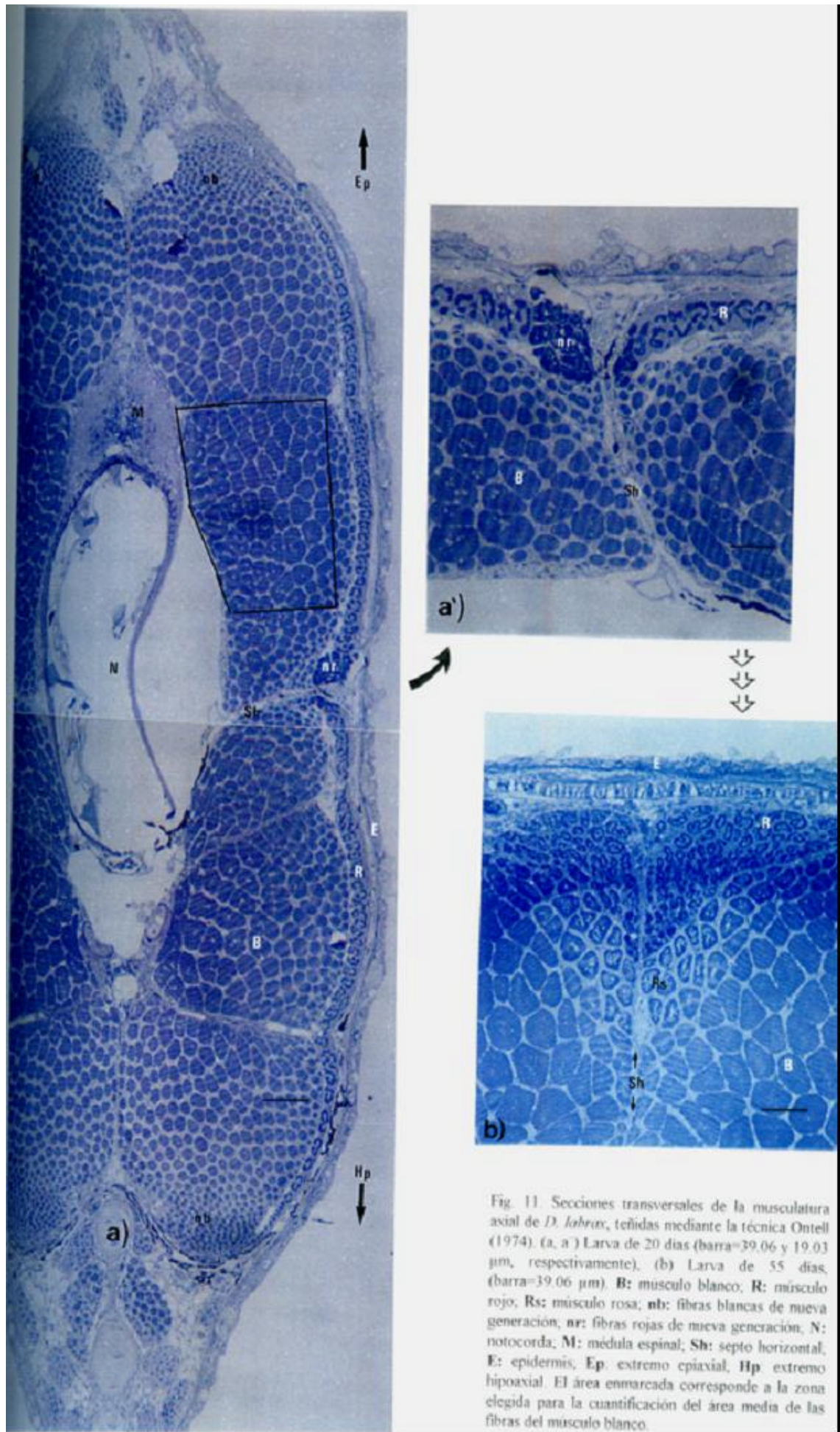


Fig. 11. Secciones transversales de la musculatura axial de *D. labrax*, teñidas mediante la técnica Ontell (1974). (a, a') Larva de 20 días (barra=39.06 y 19.03 μm , respectivamente). (b) Larva de 55 días, (barra=39.06 μm). **B**: músculo blanco; **R**: músculo rojo; **Rs**: músculo rosa; **nb**: fibras blancas de nueva generación; **nr**: fibras rojas de nueva generación; **N**: notocorda; **M**: médula espinal; **Sh**: septo horizontal; **E**: epidermis; **Ep**: extremo epiaxial; **Hp**: extremo hipoaxial. El área enmarcada corresponde a la zona elegida para la cuantificación del área media de las fibras del músculo blanco.

- Introducir los cortes durante 5 minutos en tampón fosfato pH:7.
- Lavar muy bien con agua destilada.

III-3.3.2. TINCIÓN.

- Previamente debemos fabricar dos soluciones: Solución A (0.4% de fucsina básica en metanol al 25%) y solución B (mezclar volúmenes iguales de Azur II al 1% en agua destilada, Azul de metileno al 1%, Bicarbonato sódico al 5% y Alcohol metílico absoluto). A la solución obtenida de la mezcla se le añade una cantidad igual de agua destilada:
- Teñir durante 7-8 minutos en la solución A calentada a 54 °C.
- Lavar bien con agua destilada.
- Teñir durante 20 segundos en la solución B también a 54 °C.
- Lavar varias veces en agua destilada. Si la tinción es débil reteñir en la solución B durante algunos segundos más.
- Secar los portas al aire.
- Pasar los portaobjetos por xilol y montar con D.P.X.

III-4. FOTOGRAFIADO.

Con el fin de hacer más cómoda la interpretación de los resultados morfométricos, se realizaron fotografías de los campos histológicos después de las tinciones. Las preparaciones de microscopía óptica son fotografiadas a color con un microscopio LEITZ DIALUX 20, con equipo automático de fotografiado.

III-5. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

III-5.1. PARÁMETROS.

El análisis morfométrico consistió en la cuantificación de los siguientes parámetros en cada uno de los ejemplares:

- *Área transversal total de los músculos rojo y blanco. Área transversal total del miotomo.*
- *Número de fibras de los músculos blanco y rojo.*
- *Área y diámetro mínimo de las fibras de los músculos blanco y rojo.*

III-5.1.1. ÁREAS TOTALES DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL DE LOS MÚSCULOS BLANCO Y ROJO. ÁREA TRANSVERSAL TOTAL DEL MIOTOMO.

Las áreas transversales de los músculos blanco y rojo se midieron por separado en las dos mitades corporales de cada larva. El músculo rosa, definido según sus características estructurales desde los 50 días, aproximadamente, ha sido considerado como parte del músculo blanco, a efectos morfométricos.

El área transversal total del miotomo se halló mediante la suma de las áreas de los músculos rojo y blanco. El área total del miotomo incluye las dos mitades del cuerpo de la larva, excluyéndose la musculatura de las aletas dorsal y ventral. Se determinó también la proporción de los músculos rojo y blanco, respecto al total del miotomo, a lo largo del desarrollo.

Las mediciones se realizaron a partir de las secciones teñidas mediante la técnica Ontell (1974), excepto en los últimos estadios de las experimentos 1º y 2º (escamación y 120 días en *D. labrax* de 1996, y a los 90 días en el stock de *D. labrax* de 1997). En dichos estadios, dado el gran tamaño de estas larvas, se realizaron secciones transversales de la totalidad de la larva a nivel de la apertura anal, y las muestras obtenidas se congelaron en 2-metilbutano, enfriado sobre nitrógeno líquido. Posteriormente, se seccionaron en criostato Reichert Jung (modelo Criocut E) a 8 µm. de grosor, y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Las imágenes se captaron mediante cámara de vídeo conectada a un microscopio Axioskop (Zeiss) a diversos aumentos. La medición se realiza sobre el monitor, mediante un sistema de análisis de imagen disponible en el Servicio de Estudio y Proceso Digital de Imágenes de la Universidad de Murcia. El hardware consiste en el Sistema IMCO 10 Kontron bildanalyse (IMCO 10 Image Computer), mientras que el software lo compone el paquete MIP.

III-5.1.2. NÚMERO Y ÁREA DE LAS FIBRAS DE LOS MÚSCULOS BLANCO Y ROJO.

Se contaron y midieron las fibras de los músculos blanco y rojo de la sección transversal del miotomo. Mediante la cuantificación del área transversal de las fibras a lo largo de los estadios se valora la hipertrofia muscular. El análisis morfométrico incluyó también la cuantificación del diámetro mínimo de las fibras, si bien, dado que los resultados fueron similares a los obtenidos para el área fibrilar, no hemos hecho referencia a este parámetro en la exposición del trabajo. No obstante, los resultados correspondientes quedan recogidos, en su mayoría, en el Anexo. La hiperplasia muscular se obtiene al comparar el número total de fibras musculares que presentan los ejemplares de cada tanque en cada estadio larvario. El contaje fibrilar se realizó directamente sobre montajes fotográficos a un aumento suficiente.

III-5.2. NÚMERO DE EJEMPLARES MEDIDOS.

Para la medición de los parámetros musculares referidos se utilizaron 5 ejemplares de cada tanque en cada estadio de toma de muestras, excepto en los últimos estadios de los experimentos 1º y 2º (120 días en *D. labrax* de 1996, y 90 días en el stock de *D. labrax* de 1997), en los que se midieron 2 larvas/tanque (*D. labrax* de 1996) y 2-4 larvas/tanque (*D. labrax* de 1997).

III-5.3. NÚMERO DE ESTRUCTURAS MEDIDAS EN CADA EJEMPLAR.

III-5.3.1. NÚMERO DE FIBRAS.

Se contaron todas las fibras blancas y rojas correspondientes a una mitad corporal de la larva (a partir del septo transversal y hacia los límites epi e hipoaxial de la sección transversal del miotomo). Este contaje no se pudo realizar en los estadios correspondientes a la escamación y a los 120 días de *D. labrax* de 1996 (experimento 1º); y a los 90 días en *D. labrax* de 1997 (experimento 2º). Esto fue debido al gran tamaño que presentaban los

ejemplares en estos últimos estadíos, lo que dificultó el procesado y no nos permitió realizar un contaje preciso del número de fibras en las muestras obtenidas. Por ello, en estos estadíos se realizó una estimación del número de fibras blancas a partir de los datos correspondientes al área transversal del músculo blanco y su área fibrilar, de manera que dividiendo ambos parámetros se halló un número estimado o teórico de fibras blancas, para este estadío.

III-5.3.2. ÁREA MEDIA DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL DE LAS FIBRAS.

A la eclosión y a la apertura de la boca, se midieron la práctica totalidad de las fibras blancas y rojas de una mitad corporal de la larva (desde el septo transversal hacia los límites epi e hipoaxial del miotomo). Desde el siguiente estadío (15-20 días) hasta el final de cada experimento, dado el gran número de fibras, se eligió una zona representativa en la que se midieron todas las fibras. Esta zona del miotomo se corresponde con la zona intermedia de los cuadrantes epi e hipoaxiales (Fig. 11a), y proporciona un número suficiente de fibras, para hacer significativo el muestreo, con fines estadísticos.

Para la obtención de todos los resultados morfométricos se han utilizado los medios del Servicio de Estudio y Proceso Digital de Imágenes de la Universidad de Murcia.

III-6. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Los resultados obtenidos han sido interpretados bajo dos perspectivas: crecimiento absoluto y tasas de crecimiento y desarrollo.

➤ El **crecimiento absoluto o neto** es una descripción cuantitativa de cómo acontece el crecimiento del miotomo, en sus dos componentes: hipertrofia e hiperplasia. Estos mecanismos de crecimiento han sido cuantificados en cada estadío de toma de muestras, mediante la medición de todos los parámetros musculares (área y número de fibras blancas y rojas, y sección transversal de los músculos blanco, rojo y total del miotomo). Los resultados obtenidos (en valor absoluto) se expresan mediante el valor

medio de cada parámetro y su error estándar ($\bar{X} \pm \text{sem}$). En el capítulo de resultados, sólo se hace referencia a los valores medios (\bar{X}), omitiendo el error estándar (sem) con el fin de simplificar su exposición y representación gráficas. No obstante, el Anexo que se adjunta al final de este trabajo recoge todos los datos mencionados.

El análisis estadístico de los datos se realizó con los programas STATGRAPHICS (3.0), y SYSTAT (P.win. 5.0). En este sentido, se ha utilizado la estadística descriptiva y el análisis de la varianza, para un grado de confianza que en ningún caso fue menor al 95% (Anova, $p < 0.05$). El análisis “post-hoc” se realizó mediante el test de Tuckey. El análisis de la varianza se aplicó para cada uno de los estadíos de toma de muestras, lo que nos permitió determinar la influencia de la temperatura de incubación y de cultivo, así como la interacción entre temperatura de incubación/temperatura de cultivo ($T^{\text{a inc.}} * T^{\text{a cult.}}$), sobre el tamaño del miotomo y sobre el área y número de fibras, en las diferentes etapas de crecimiento larvario.

El análisis estadístico llevado a cabo en 1997 (experimento 2º) se realizó siguiendo un doble criterio, dado que se emplearon 2 poblaciones de *D. labrax* genéticamente distintas: por un lado, se trataron los datos separando ambas poblaciones, lo que nos permite definir el comportamiento propio de cada población frente a la temperatura. Por otro lado, se realizó un tratamiento conjunto agrupando los resultados hallados en ambas poblaciones, con lo que se pretende valorar la existencia de diferencias en la dinámica de crecimiento muscular entre las dos poblaciones.

Finalmente, se realizaron histogramas de frecuencia del área de las fibras, lo que permite caracterizar la población fibrilar en cada ejemplar, y, poder así, comparar su distribución (% de cada tamaño) en cada combinación de temperaturas.

➤ **Tasa de crecimiento muscular y tasa de desarrollo.** La tasa de crecimiento muscular se corresponde con el crecimiento relativo o incremento diario que experimenta el músculo; y la **tasa de desarrollo** equivale a la inversa de los días necesarios para completar un estadío de desarrollo dado.

Ambos conceptos, por tanto, muestran la eficiencia de dos parámetros biológicos que están estrechamente relacionados: crecimiento muscular y desarrollo corporal de las larvas (Atkinson, 1996), por lo que, la valoración del efecto de la temperatura sobre la fase larvaria, implica el estudio de ambos fenómenos. Con el fin de asociar estos dos parámetros, la tasa de crecimiento fue calculada en 3 estadíos de desarrollo característicos: eclosión, apertura de la boca y escamación.

➤ A partir de la representación gráfica de los valores de las tasas de crecimiento muscular y de desarrollo corporal, se han hallado **ecuaciones experimentales** que tratan de expresar numéricamente el grado de sensibilidad del crecimiento muscular y del desarrollo corporal frente a la temperatura, a lo largo de la fase larvaria.

Las ecuaciones experimentales obtenidas para la tasa de desarrollo y de crecimiento vienen expresadas de la siguiente manera: $D=a+bT^a$, y $C=a+bT^a$ donde **D** y **C** son tasa de desarrollo y tasa de crecimiento, respectivamente; **T^a** es la temperatura y **b** es la pendiente de la recta. Estas ecuaciones se han realizado mediante interpolación o ajuste lineal, según los casos, de los datos hallados para cada estadio de desarrollo frente a la temperatura. La pendiente de la recta obtenida, representa numéricamente la sensibilidad del crecimiento y del desarrollo frente a la temperatura. Es importante señalar que el objetivo de estas ecuaciones es meramente orientativo, ya que necesitaríamos mayor número de datos para poder hallar una ecuación que defina realmente la sensibilidad del desarrollo y del crecimiento muscular de *D. labrax* frente a la temperatura. No obstante, las ecuaciones obtenidas aportan una visión aproximada de la tendencia de ambos procesos frente a la temperatura en esta especie, facilitando la comprensión de los resultados. Similares ecuaciones han sido halladas por otros autores para describir la influencia de la temperatura sobre el desarrollo larvario de los peces (Winberg, 1987, citado por Kamler, 1992).

Para este tipo de estudios, los estadios de desarrollo incluidos en este trabajo han sido los siguientes: eclosión, apertura de la boca y escamación; hechos biológicos que determinan el final de los períodos embrionario, prelarvario y larvario, respectivamente. Los mecanismos de crecimiento hipertrófico e hiperplásico dependen de numerosos factores, tales como las características del desarrollo larvario, la pauta de alimentación, etc. Para comprender el efecto de la temperatura sobre los estadios de desarrollo, es importante conocer las características que los definen. Los aspectos más destacados de estas fases son los siguientes:

⊗ **Período de incubación:** es la fase embrionaria, que comprende desde la fertilización hasta la eclosión.

⊗ **Período prelarvario o eleuteroembrionario:** es un período inactivo, en el que la larva recién eclosionada permanece flotando en la superficie del agua. Durante esta

etapa inicial la larva aún no ha abierto la boca y se mantiene de las reservas vitelinas. Este período comprende desde la eclosión hasta la apertura de la boca.

∞ **Período larvario:** es una fase de transición (metamorfosis) en la que acontecen una serie de cambios morfológicos y funcionales que culminan con la madurez biológica de los tejidos y órganos, con la excepción de los órganos reproductivos. Así, durante esta etapa las agallas se hacen funcionales y la monocapa muscular roja adquiere las características propias del músculo rojo adulto. La larva es capaz de alimentarse por sí misma, y el comportamiento natatorio va perfeccionándose, coincidiendo con la transición de las fibras larvarias a adultas (Batty, 1984; Blaxter, 1988, citado por Kamler, 1992). Como referencias principales para definir este período, se considera que comienza con la apertura de la boca y se completa con la aparición de las escamas, hecho que determina el fin de la metamorfosis larvaria y el comienzo de la etapa de alevín.

El siguiente cuadro (Tabla 5) resume los 3 experimentos incluidos en este trabajo, y recoge las tomas de muestras que engloba cada estadio de desarrollo:

Tabla 5.

	Experimento 1° (1996) <i>D. labrax mediterránea</i>	Experimento 2° (1997) <i>D. labrax atlántica y mediterránea</i>	Experimento 3° (1998) <i>D. labrax atlántica</i>
Estadios de desarrollo	Toma de muestras y edad de los ejemplares		
Período embrionario.	Eclosión.	Eclosión.	Eclosión.
Período prelarvario.	Apertura boca: 5-8 d.	Apertura boca: 3-6 d.	Apertura boca: 3-4 d.
Período larvario.	- 15 días. - Inicio destete: 35 días. - Fin destete: 50 días.	- 20 días. - Inicio destete: 48-55 d.	- 20 días - 40 días.
Fin metamorfosis larvaria.	Escamación: 78-110 días.	Escamación: 52-73 días.	
Inicio de la fase postlarvaria.	120 días .	90 días.	

IV.-RESULTADOS

IV.-RESULTADOS

Como ya indicamos en el capítulo de material y métodos, este trabajo incluye varias experiencias realizadas con diferentes poblaciones de lubina, *Dicentrarchus labrax* L. El primer experimento se llevó a cabo en **1996**, con larvas de *D. labrax* **mediterránea** sometidas a diferentes regímenes de temperatura, con el fin de estudiar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo y el crecimiento larvario de esta especie. Para ello se midieron los parámetros musculares, las tallas y pesos corporales de las larvas, y se registraron algunos datos referentes a la supervivencia.

Tras esta primera experiencia, pretendimos abordar con más profundidad el efecto de la temperatura, introduciendo diferentes regímenes de temperatura a los empleados anteriormente, y estudiando su efecto en dos poblaciones de *D. labrax*: **atlántica y mediterránea**, procedentes de reproductores genéticamente distintos. Con ello evaluamos la influencia del componente genético y de la temperatura sobre la capacidad de crecimiento larvario y postlarvario de esta especie. Este último trabajo se llevó a cabo en **1997**, y en él se midieron los mismos parámetros que en 1996, pero se incluyeron otras medidas, tales como el tamaño de los huevos de la puesta de ambas poblaciones de *D. labrax*, la longitud de los sacos vitelinos y la supervivencia final.

Finalmente, se realizó una prueba adicional a partir de una puesta de *D. labrax* **atlántica** obtenida en **1998**. La finalidad de esta prueba complementaria fue la de

introducir algunas modificaciones en la temperatura de incubación, y comparar sus resultados con los obtenidos en los experimentos anteriores.

En la exposición de los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos, vamos a seguir el siguiente orden:

1º Descripción general de la estructura de la musculatura axial.

2º En cada uno de los experimentos, se muestran en primer lugar los resultados correspondientes al **crecimiento muscular absoluto o neto** ($\bar{X} \pm \text{sem}$). El crecimiento muscular, en valores absolutos, ha sido hallado en cada estadio de toma de muestras para todos los parámetros musculares (área y número de fibras blancas y rojas; y áreas transversales de los músculos blanco, rojo y total del miotomo).

3º A continuación, se realiza la valoración del efecto de la temperatura sobre la **tasa de crecimiento de la musculatura y la tasa de desarrollo corporal**. Ambos parámetros se han calculado para tres estadios de desarrollo característicos:

- Período de incubación o fase embrionaria: comprende desde la fertilización hasta la eclosión.
- Período prelarvario o eleuteroembrionario: desde la eclosión hasta la apertura de la boca.
- Período larvario: comienza con la apertura de la boca y la reabsorción del saco vitelino, y se completa con la aparición de las escamas, lo que determina el final de la metamorfosis.

➤ **La tasa de crecimiento muscular** (crecimiento relativo) indica el incremento diario que experimenta el músculo (crecimiento absoluto/días transcurridos para alcanzarlo), y ha sido hallada en los estadios de desarrollo (eclosión, apertura de la boca y escamación) para los parámetros más representativos: área total del miotomo, y número y área media de las fibras blancas. Dado que los estadios de desarrollo se completan antes en los ejemplares cultivados a altas temperaturas, el concepto de tasa de crecimiento nos permite hallar la *eficiencia o velocidad de crecimiento muscular* de las larvas sometidas a diferentes regímenes de temperaturas.

➤ La **tasa de desarrollo** equivale a la inversa de los días necesarios para completar un determinado estadio de desarrollo.

➤ A partir del cálculo de dichas tasas hemos obtenido **ecuaciones experimentales** que tratan de expresar numéricamente el grado de sensibilidad del crecimiento y del desarrollo, frente a la temperatura.

4º) Representación gráfica de los datos de los parámetros corporales más importantes, fundamentalmente longitudes y pesos corporales; así como supervivencias.

5º) Corolario: se compara el crecimiento muscular entre algunas de las poblaciones incluidas en este trabajo, a las que se les aplicaron diferentes temperaturas de incubación. Además, se realiza el tratamiento conjunto de las tasas de desarrollo obtenidas en todas las poblaciones con el fin de hallar la tendencia general del desarrollo corporal de esta especie frente a la temperatura.

6º) Anexo (véase al final de la monografía): incluye las tablas donde se recogen detalladamente los valores de los parámetros musculares medidos en este estudio.

Aunque vamos a describir los resultados hallados en todos los lotes, estos serán tratados con más profundidad en la experiencia de 1997, que constituye el eje principal de este trabajo, ya que contiene un mayor número de aspectos que en el resto de experimentos.

Describimos a continuación, las características generales que presenta el miotomo de las larvas a lo largo de este estudio.

IV-1. ESTRUCTURA DE LA MUSCULATURA AXIAL

A la **eclosión** (día cero) (Fig. 12), las larvas de *D. labrax* presentan 2 estratos musculares: músculo superficial rojo y músculo interno blanco. Las fibras superficiales integran una monocapa, característica de los estadios iniciales larvarios. Estas fibras se extienden desde el septo horizontal hasta los extremos epi e hipoaxiales del miotomo, y están situadas bajo la piel, dispuestas a modo de columna. Poseen gran porcentaje de mitocondrias, que ocupan la zona del sarcoplasma más próxima a la piel.

Las fibras blancas internas son poligonales y constituyen la mayor parte de la sección transversal del miotomo. La miofibrillogénesis es todavía incompleta, y suelen presentar un núcleo central, característico de las fibras inmaduras (miotubos).

En el momento de la **apertura de la boca** (3-8 días) aún se observan núcleos en posición central en las fibras blancas, si bien se aprecia un aumento considerable del contenido miofibrilar (Fig. 13).

Desde los 15-20 días, las fibras blancas están perfectamente diferenciadas, con un alto contenido de miofibrillas, y los núcleos situados en la periferia (Figs. 11a,a', 14). Se aprecian zonas germinales de fibras de nueva generación en los extremos epi e hipoaxiales del miotomo, y en la estrecha zona situada en el límite entre los músculos blanco y rojo que se extiende desde el septo horizontal hasta las zonas apicales. De igual forma, comienzan a observarse algunas fibras pequeñas, muy escasas, entremezcladas en el grosor de la zona intermedia del miotomo. En esta etapa se observan también nuevas fibras rojas que presentan alto contenido miofibrilar y escasas mitocondrias. Estas fibras se sitúan bajo la monocapa de fibras superficiales, agrupadas a nivel del septo horizontal, y a los 40-50 días constituyen un estrato de 5-7 capas de fibras. Al mismo tiempo, entre los músculos rojo y blanco se van diferenciando las fibras del músculo rosa, caracterizadas por un contenido relativamente abundante tanto en mitocondrias como en miofibrillas.

Al **final del desarrollo larvario y en la etapa postlarvaria**, los tres estratos musculares (músculos rojo, intermedio o rosa y blanco) son histológicamente diferenciables (Figs. 11b). Se observa una gran diversidad de tamaños fibrilares extendida

por todo el grosor del miotomo (Fig. 15), constituyéndose el mosaico característico de las especies que alcanzan un gran tamaño durante la fase adulta (Weatherley y Gill, 1981; Weatherley *et al.*, 1988).

En los extremos apicales del miotomo, el número de fibras pequeñas disminuye debido a un aumento de su área fibrilar, respecto a estadíos anteriores; y bajo el músculo rojo continúa observándose una zona proliferativa de fibras.

En estas fases, el músculo rojo manifiesta también cierta apariencia de mosaico, por la aparición de fibras pequeñas de nueva generación.

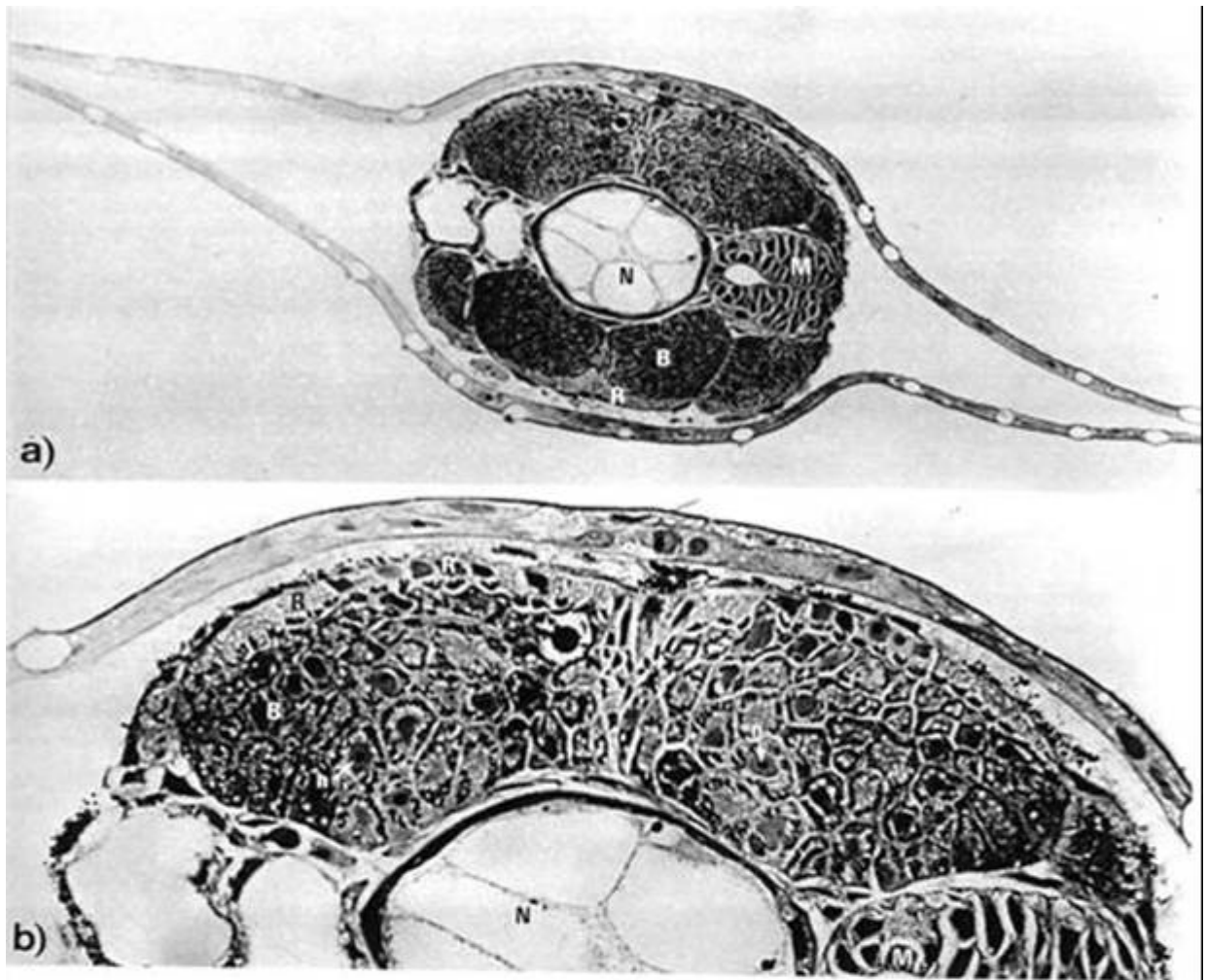


Fig. 12. (a,b) *D. labrax* de 1 día, incubada a 17 °C. B: músculo blanco; R: monocapa de fibras rojas; n: núcleo de miotubo, N: notocorda, M: médula espinal. (x350, y x850, respectivamente).

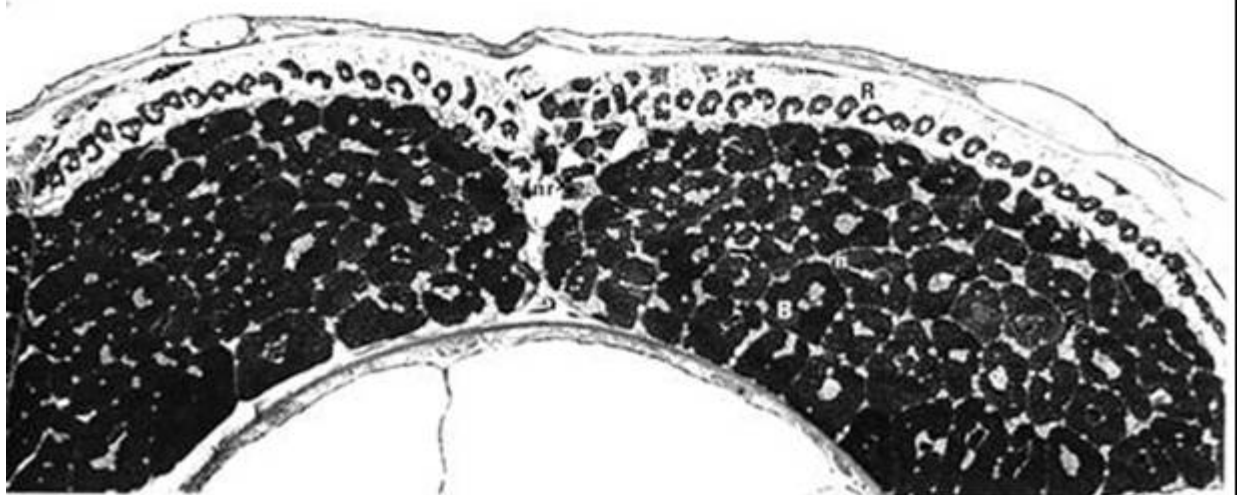


Fig. 13. *D. labrax* al final de la fase prelarvaria (6 días), mantenida a 15 °C/ambiente (x832). B: músculo blanco; R: monocapa de fibras rojas, n: núcleo; nr: fibras rojas de nueva generación.

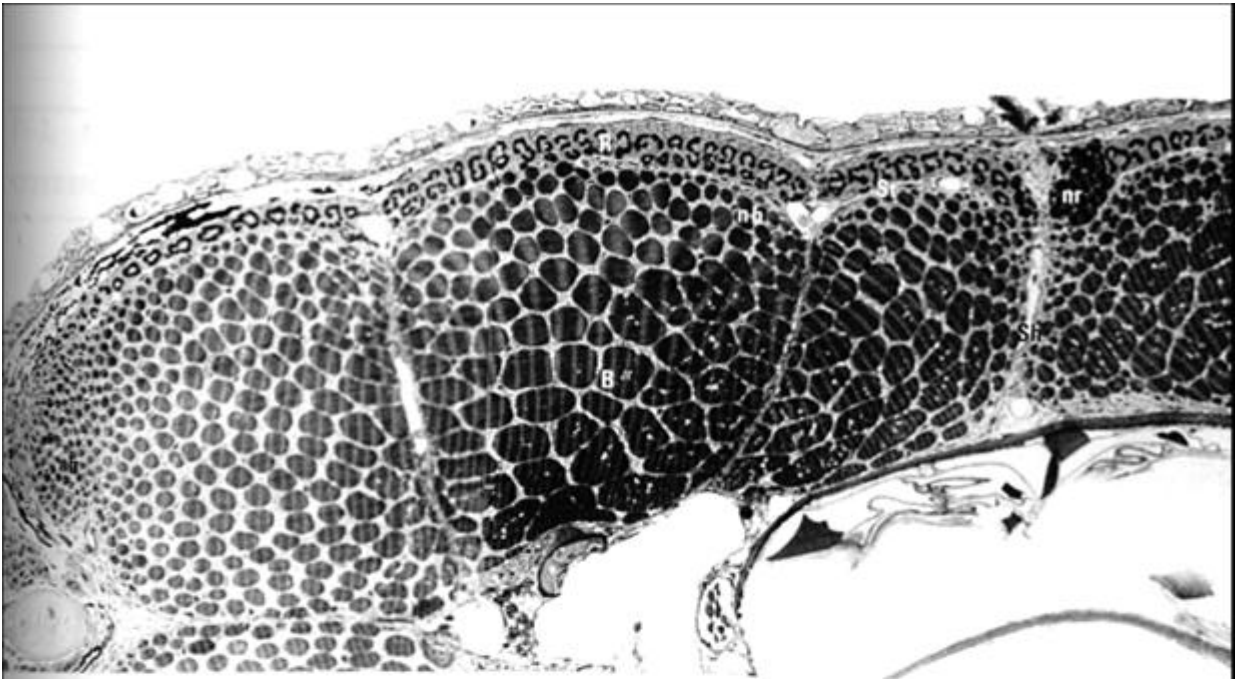


Fig. 14. Larva de 20 días de *D. labrax* sometida a 15/19 °C (x330). **B**: músculo blanco; **R**: músculo rojo; **nr**: fibras rojas de nueva generación; **nb**: fibras blancas de nueva generación; **Sh**: septo horizontal. **St**: septo transverso.

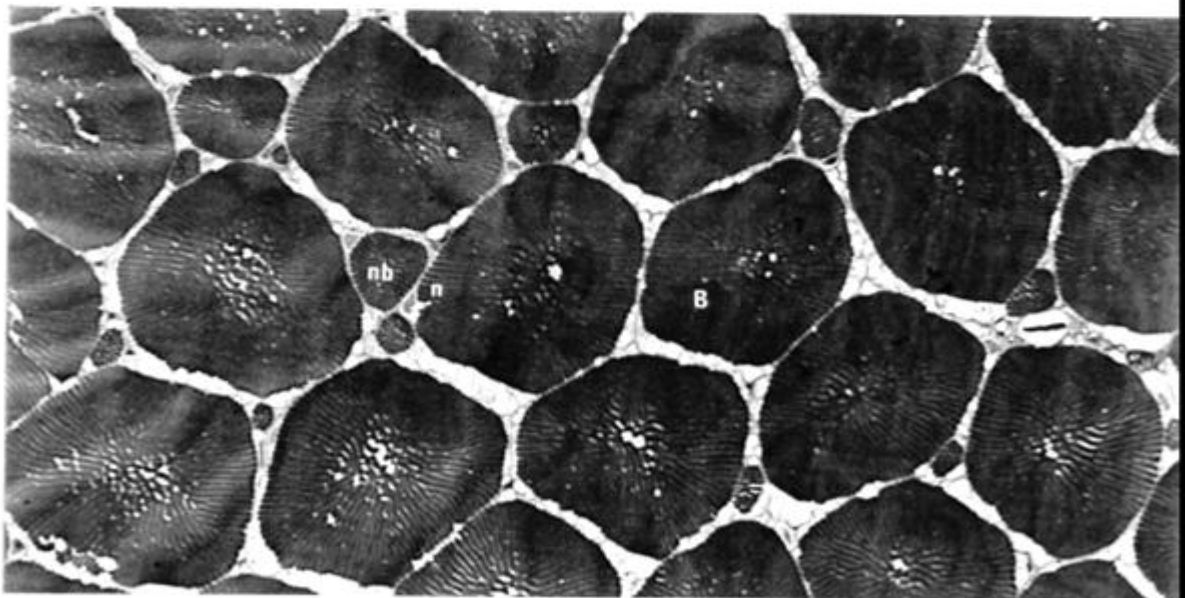


Fig. 15. Músculo blanco de larva de *D. labrax* de 55 días (fin de la metamorfosis) sometida a 17/19 °C (x323). Se observa un mosaico de tamaños fibrilares. **B**: fibras del músculo blanco, **nb**: fibras blancas de nueva generación. **n**: núcleo.

IV-2. CRECIMIENTO MUSCULAR Y DESARROLLO LARVARIOS: EXPERIMENTO 1° (1996).

En el estudio llevado a cabo en 1996, se emplearon ejemplares procedentes de una puesta de *D. labrax* mediterránea, sobre los cuales se aplicaron las siguientes combinaciones de T^ainc/T^acultivo: 15 °C/ambiente, 17 °C/ambiente, 15/17 °C, 17/17 °C.

La temperatura ambiente inicialmente fue de $\cong 15$ °C, y aumentó progresivamente de forma gradual (ver Fig. 7 de material y métodos).

En primer lugar, se exponen los resultados más significativos ($\bar{X} \pm \text{sem}$) correspondientes al crecimiento absoluto o neto de los parámetros musculares. Con el fin de simplificar los resultados obtenidos, sólo se presentan las gráficas más representativas. No obstante, en el Anexo que complementa los resultados se incluyen las tablas que recogen todos los datos hallados en este estudio.

La valoración estadística de los datos se ha realizado mediante un Análisis de la Varianza (Anova, $p < 0.05$) considerando conjuntamente las cuatro combinaciones de temperatura empleadas. En el análisis *post hoc* se empleó el test de Tukey.

IV-2.1. CRECIMIENTO MUSCULAR.

Las Figs. 16-18 representan el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la musculatura desde la eclosión hasta el final del estudio. Tal y como se puede apreciar, la dinámica de crecimiento muscular y el efecto que ejerce la temperatura sobre ella, varían en las diferentes etapas del desarrollo larvario.

Los resultados más significativos hallados en cada una de estas etapas fueron los siguientes.

IV- 2.1.1. FASES EMBRIONARIA Y PRELARVARIA.

En esta etapa incluimos dos hechos biológicos relacionados con el desarrollo: **eclosión** (día cero o final de la fase embrionaria) y **apertura de la boca** (5-8 días posteclosión, final de la fase prelarvaria).

Durante la fase prelarvaria se aprecia un aumento en el *área de las fibras blancas* respecto a la eclosión, mientras que el *número de fibras blancas y rojas* permanece prácticamente constante, no observándose una repercusión significativa de la temperatura sobre ambos procesos (hipertrofia e hiperplasia fibrilares) (Fig. 16b-d). Al final de la fase prelarvaria (5-8 días), el *área de las fibras rojas* de las larvas cultivadas a temperatura ambiente es significativamente mayor que en larvas cultivadas a 17 °C de cultivo ($p < 0.05$) (Fig. 16e).

IV-2.1.2. FASES LARVARIA Y POSTLARVARIA.

Describimos en esta etapa el crecimiento muscular que tiene lugar desde el comienzo de la alimentación externa hasta el final del desarrollo larvario (fase larvaria) y a los 120 días (fase postlarvaria). Para su exposición, desglosamos esta etapa en dos: desde los 15 hasta los 50 días; y desde el final de la metamorfosis larvaria (escamación) en adelante.

IV-2.1.2.1. 15-50 DÍAS (Figs. 16 y 17).

Los resultados hallados en esta fase se exponen separando el efecto de la temperatura de cultivo del efecto causado por la temperatura de incubación, con el fin de facilitar la descripción de la influencia de ambas variables sobre el crecimiento muscular.

Efecto de la temperatura de cultivo.

Para estudiar este efecto se comparan ejemplares que, habiendo sido incubados a una misma temperatura, fueron aclimatados tras la eclosión a diferentes temperaturas de cultivo (15 °C/ambiente frente a 15/17 °C; y 17 °C/ambiente frente a 17/17 °C). No obstante, tal y como indicamos anteriormente, el tratamiento estadístico (Anova), así como las representaciones gráficas se realizan teniendo en cuenta las 4 combinaciones de temperatura conjuntamente. Los resultados del test de Tukey sólo se exponen para precisar diferencias concretas entre determinados tanques de cultivo.

Con el comienzo de la alimentación se observa una activación del crecimiento muscular en las larvas cultivadas a mayor temperatura (17 °C). Así, **desde los 15**

hasta los 50 días se observa un efecto positivo de las altas temperaturas de cultivo sobre la hipertrofia e hiperplasia de las fibras blancas y rojas (Fig. 16b-e); de tal forma, que el crecimiento de todos los parámetros fibrilares medidos es significativamente mayor en larvas cultivadas a 17 °C (excepto el número de fibras rojas a los 15 días), mostrando el número de fibras blancas un nivel de significación mayor que el área de fibras blancas (por ejemplo, a los 35 días, $p=0.036$ para el área de las fibras; $p=0.000$ para el número de fibras blancas).

Efecto de la temperatura de incubación.

En este caso comparamos ejemplares cuyos huevos fueron incubados a diferentes temperaturas, pero sometidos tras la eclosión a una misma temperatura de cultivo (15 °C/ambiente frente a 17 °C/ambiente; 15/17 °C frente a 17/17 °C).

Desde los **15 a los 37 días** no se observa un efecto significativo de la temperatura de incubación. No obstante, a los 37 días (inicio del destete), los ejemplares que habían sido incubados a 17 °C y cultivados posteriormente a temperatura ambiente (17 °C/ambiente) presentaron un mayor número de fibras blancas que los incubados a 15 °C (15 °C/ambiente), aunque estas diferencias no fueron significativas (Fig. 16b). El estudio de la distribución de tamaños fibrilares a esta edad (Fig. 17), mostró la existencia de una mayor proporción de fibras blancas menores de 50 μm^2 en los ejemplares incubados a 17 °C, independientemente de la temperatura de cultivo.

A los **50 días**, se observó que, al comparar larvas que habían sido mantenidas en unas mismas condiciones de cultivo, el área y número de fibras blancas y rojas eran mayores si previamente la temperatura de incubación había sido alta (Fig. 16). El análisis estadístico (Anova) reveló que este efecto era significativo sobre el número de fibras blancas ($p=0.005$) y el área de las fibras rojas ($p=0.000$). La aplicación del test de Tukey manifestó diferencias significativas entre los ejemplares de los tanques 17 °C/ambiente y 15 °C/ambiente, para ambos parámetros.

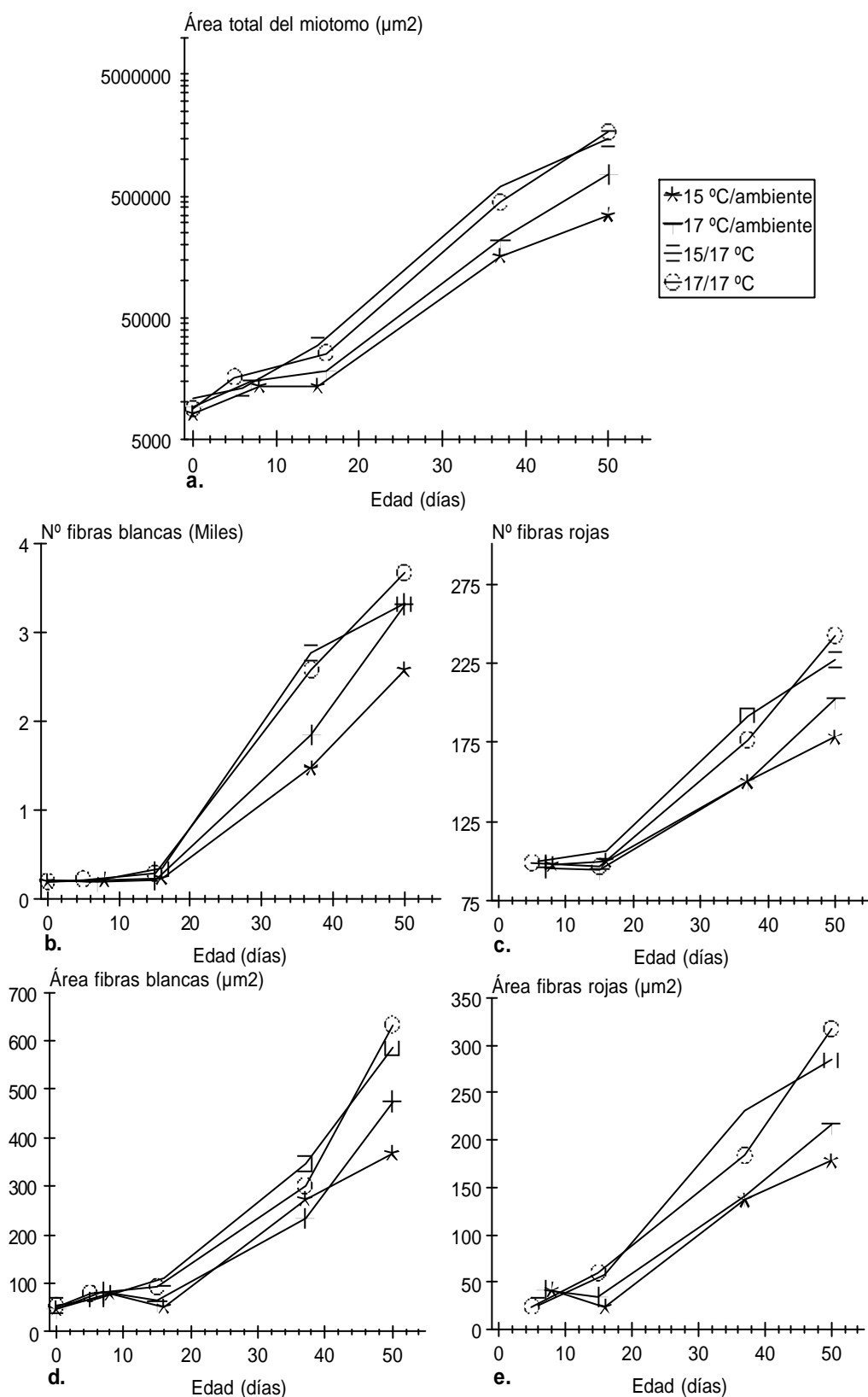


Fig. 16 (a-e). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del total del miotomo (a) y del área y número de fibras desde la eclosión hasta los 50 días (b-e). a) es una representación semilogarítmica

IV-2.1.2.2. FIN DE LA METAMORFOSIS LARVARIA (ESCAMACIÓN) Y FASE POSTLARVARIA (120 DÍAS) (Fig. 18).

La escamación determina el final del desarrollo larvario y el comienzo de la etapa postlarvaria (alevín). Las altas temperaturas adelantaron el final de la metamorfosis larvaria, que tuvo lugar a los 78 días en larvas cultivadas a 17 °C, y a los 89-110 días en larvas cultivadas a temperatura ambiente.

El crecimiento del total del miotomo a la escamación y a los 120 días, fue significativamente mayor en larvas cultivadas a 17 °C (Anova, $p=0.002$ para el área total del miotomo a la escamación), no detectándose una influencia clara de la temperatura de incubación (Fig. 18). No obstante, el número de ejemplares medidos a los 120 días (2/tanque de cultivo) no fue suficiente para realizar el tratamiento estadístico a esta edad, lo que impide valorar con precisión los resultados hallados en este caso (a los 120 días).

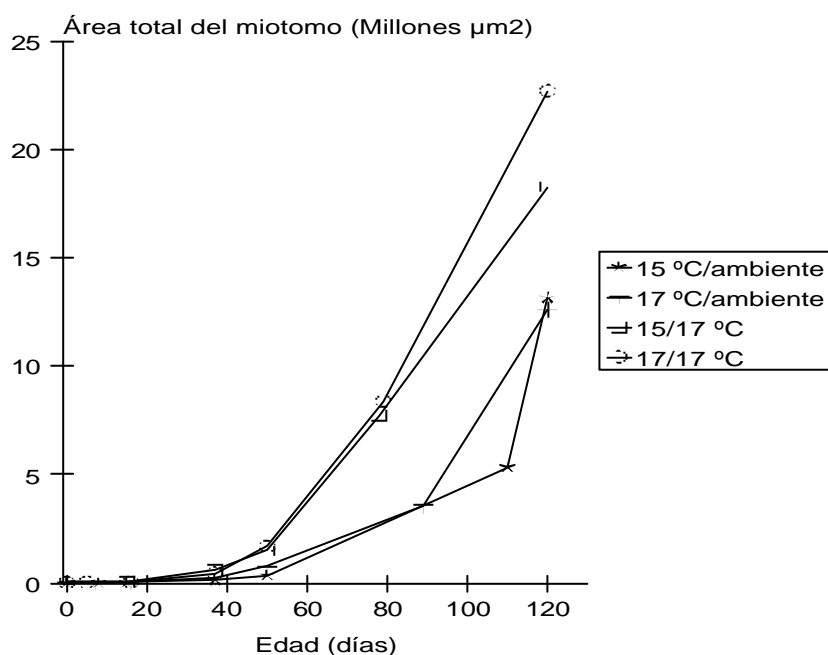


Fig. 18. Efecto de la temperatura sobre el área total del miotomo desde la eclosión hasta los 120 días.

Se describen a continuación las tasas de desarrollo y crecimiento halladas en esta población de *D. labrax*.

V-2.2. TASAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO.

IV-2.2.1. TASA DE CRECIMIENTO MUSCULAR.

La tasa de crecimiento ha sido calculada al final de los períodos embrionario (eclosión), prelarvario (apertura de la boca) y larvario (escamación). Para ello, hemos hallado el incremento diario que experimenta el miotomo en cada una de estas etapas de desarrollo, en los diferentes regímenes de temperatura, lo que nos indica la velocidad de crecimiento que tiene lugar en cada caso. A continuación, se muestran los resultados más representativos.

IV-2.2.1.1. FASES EMBRIONARIA Y PRELARVARIA.

La Fig. 19 (a-c) ilustra el incremento diario del área y número de fibras blancas, y del área total del miotomo desde la fertilización hasta la apertura de la boca, en larvas de *D. labrax* sometidas a diferentes regímenes de temperatura.

Durante la fase embrionaria, el crecimiento muscular experimenta un rápido incremento en poco tiempo, lo que se pone de manifiesto por las elevadas tasas de crecimiento hipertrófico e hiperplásico halladas a la eclosión. A su vez, el crecimiento muscular se ve incrementado en ejemplares incubados a 17 °C respecto a los incubados a 15 °C.

En la fase prelarvaria, al contrario que en el período de incubación, disminuye la tasa de crecimiento muscular en todos los tanques de cultivo.

IV-2.2.1.2. FASE LARVARIA.

Tras la apertura de la boca, la tasa de crecimiento (incremento diario) del área total del miotomo aumenta en todos los tanques de cultivo, pero este incremento es mayor en larvas cultivadas a 17 °C que a temperatura ambiente, tal y como se aprecia en la Fig. 19d.

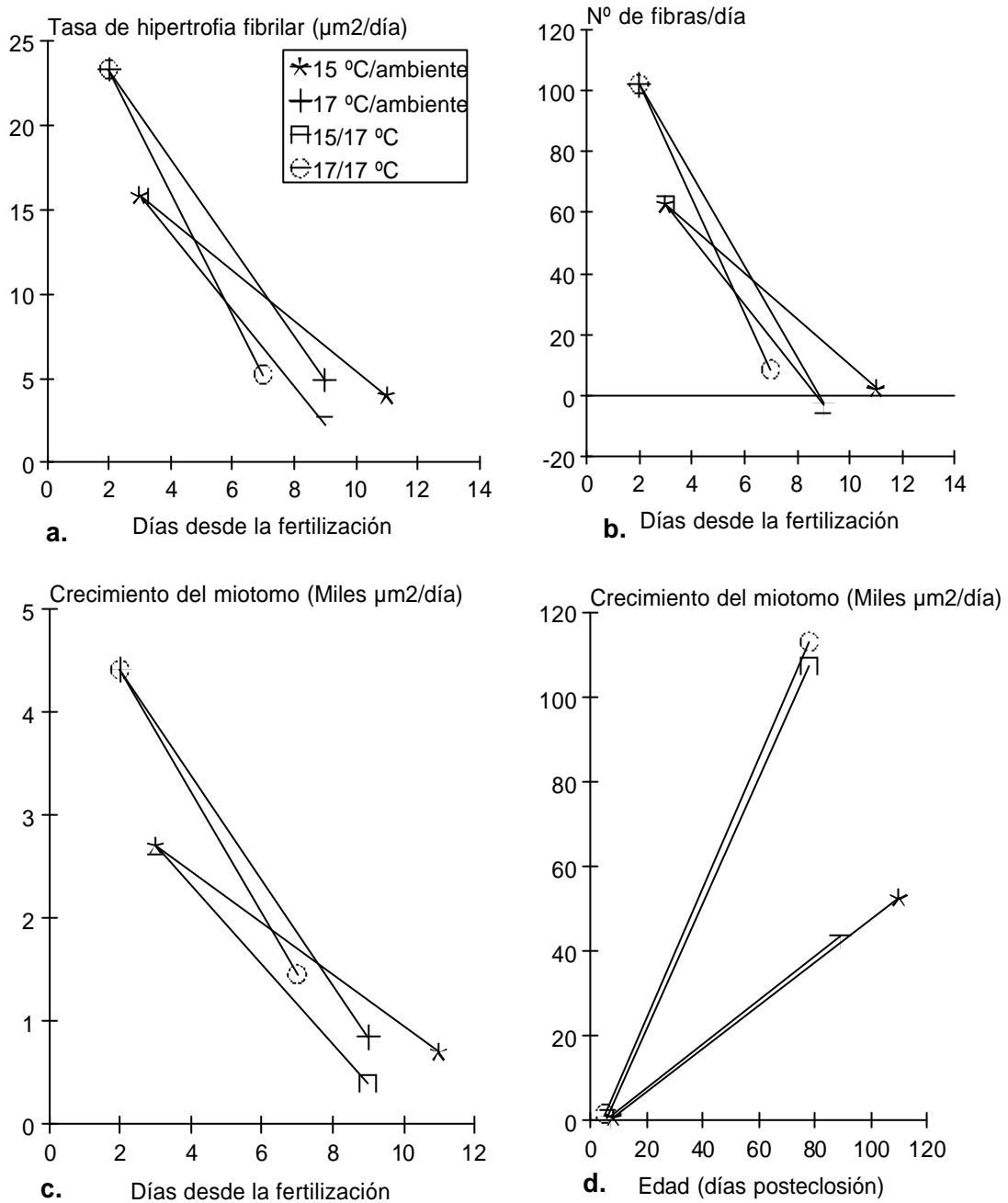


Fig. 19 (a-d). Tasa de crecimiento del área y número de fibras blancas (a,b) y del área total del miotomo (c) de *D. labrax* a la eclosión y a la apertura de la boca, mantenida a distintas temperaturas. (d) Tasa de crecimiento del total del miotomo de *D. labrax* desde la apertura de la boca hasta el final del desarrollo larvario (fase larvaria), a diferentes temperaturas.

Una vez estudiada la tasa de crecimiento de esta población de *D. labrax*, hemos representado los valores obtenidos frente a la temperatura, y, mediante interpolación, hemos obtenido **ecuaciones experimentales** de tipo lineal. Estas ecuaciones vienen expresadas como $C=a+bT^a$, donde **C** es tasa de crecimiento y **T^a** es temperatura. El valor de la pendiente de la recta (**b**) indica la influencia de la temperatura sobre la tasa de crecimiento.

Con el fin de simplificar los resultados obtenidos, sólo se exponen los datos hallados para el área total del miotomo, como parámetro más representativo del crecimiento de la musculatura. La Fig. 20 (a,b) muestra el comportamiento de este parámetro en larvas mantenidas a 15 °C/ambiente y a 17/17 °C.

La temperatura aumenta la tasa de crecimiento del miotomo, fundamentalmente tras la apertura boca, apreciándose un mayor incremento de la velocidad de crecimiento muscular al final de la metamorfosis en las larvas cultivadas a mayor temperatura (17 °C) (Fig. 20b). En las etapas iniciales del desarrollo (hasta la apertura de la boca), la influencia de la temperatura sobre el crecimiento del miotomo es mayor en el período embrionario que en el período prelarvario (Fig. 20a).

Las ecuaciones obtenidas para estos dos regímenes de temperatura fueron:

Eclosión. $C=-10048.6+850.3T^a$

Apertura de la boca. $C=-4935.3+375.6T^a$

Escamación. $C= -400994.895+30225.635T^a$

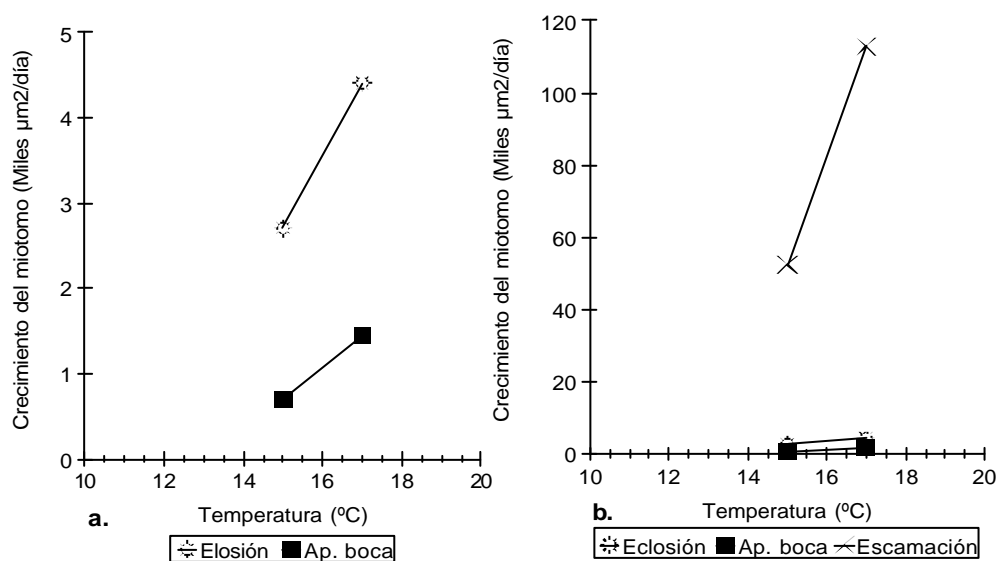


Fig. 20 (a,b). Incrementos diarios (tasas) del área total del miotomo de ejemplares de *D. labrax* a 15 °C/ambiente y a 17/17 °C, hasta la apertura de la boca (a) y hasta la escamación (b).

IV-2.2.2. TASA DE DESARROLLO.

En la tabla 2 (ver material y métodos) se resume la duración de los estadios de desarrollo estudiados en esta población de *D. labrax*.

Tal y como se deduce de dicha tabla, durante el período embrionario, las altas temperaturas de incubación aceleran el desarrollo. Tras la eclosión, las larvas cultivadas a 17 °C acortan el tiempo necesario para completar cada estadio de desarrollo, ejerciendo la temperatura de incubación un ligero efecto adicional al provocado por las altas temperaturas de cultivo.

Por otra parte, tras la eclosión, las altas temperaturas de cultivo disminuyen los grados día necesarios para completar el período prelarvario (apertura de la boca).

La Fig. 21 muestra la tasa de desarrollo de los ejemplares de *D. labrax* mantenidos a 15 °C/ambiente y 17/17 °C. Se aprecia que el desarrollo está correlacionado positivamente con la temperatura, de manera que las altas temperaturas acortan el tiempo necesario para completar cada estadio.

Las ecuaciones experimentales ($D=a+bT^a$, donde **D** es tasa de desarrollo y **T^a** es temperatura) se han obtenido de forma similar a las halladas para la tasa de crecimiento.

La influencia de la temperatura sobre el desarrollo es máxima en el período de incubación (eclosión), y disminuye progresivamente en los sucesivos estadios de desarrollo. La sensibilidad a la temperatura de la tasa de desarrollo difiere, por tanto, de la descrita anteriormente para la tasa de crecimiento del miotomo, en la que se apreciaba una mayor influencia de la temperatura tras las fases iniciales del desarrollo.

Las ecuaciones halladas para cada estadio de desarrollo fueron las siguientes:

Eclosión. $D = -0.944 + 0.085 T^a$.

Apertura de la boca. $D = -0.3 + 0.03 T^a$.

Escamación. $D = -0.013 + 0.001 T^a$.

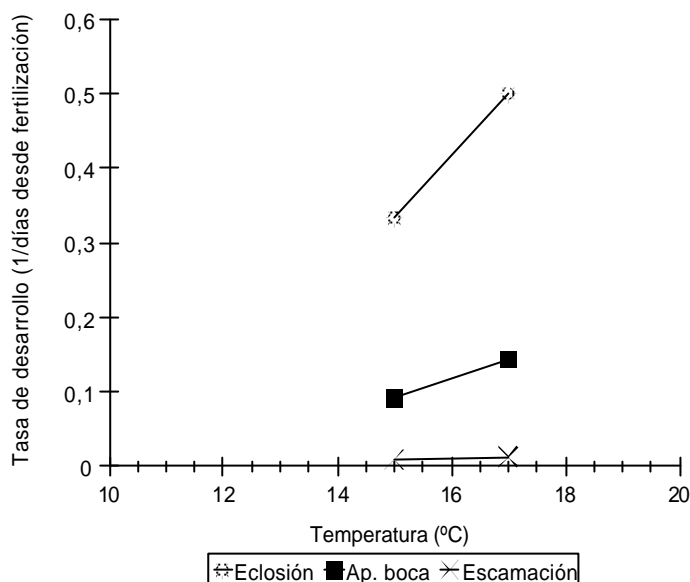


Fig. 21. Tasa de desarrollo de *D. labrax* a diferentes temperaturas.

IV-2.3. LONGITUDES Y PESOS. SUPERVIVENCIA.

Los datos correspondientes a las tallas y pesos corporales fueron obtenidos por el personal del I.E.O. (Centro Oceanográfico de Murcia). Exponemos a continuación los resultados obtenidos.

Las larvas de *D. labrax* eclosionaron con una longitud aproximada de 3.8-4.15mm. en todos los tanques experimentales. Durante la fase vitelina (7-8 días), la longitud de las larvas se mantuvo prácticamente constante (Fig. 22a), y no se observó influencia de la temperatura. Tras este período inicial, comenzó a aumentar la longitud de las larvas, y este incremento fue mayor a lo largo del desarrollo larvario en larvas cultivadas a 17 °C. De igual forma, el peso fue mayor en las larvas cultivadas a alta temperatura (Fig. 22b).

El final de la metamorfosis larvaria, determinado por la escamación, tuvo lugar a los 3 ± 0.4 cm. a todas las temperaturas, pero esta longitud se alcanzó antes en los ejemplares cultivados a 17 °C. A los 120 días, la longitud fue significativamente mayor en los ejemplares cultivados a altas temperaturas ($p < 0.05$).

Por otro lado, si observamos la evolución del total del miotomo frente a la longitud (Fig. 22c) vemos que, el área del total del miotomo a temperatura ambiente (15 °C/ambiente) y a 17 °C de cultivo (17/17 °C) es similar para una longitud dada, lo que indica que ambos parámetros están relacionados de forma directa y proporcional.

Por último, aunque no se contabilizó la supervivencia final, se observó que ésta fue mayor en ejemplares cultivados a temperatura ambiente, fundamentalmente a 15 °C/ambiente.

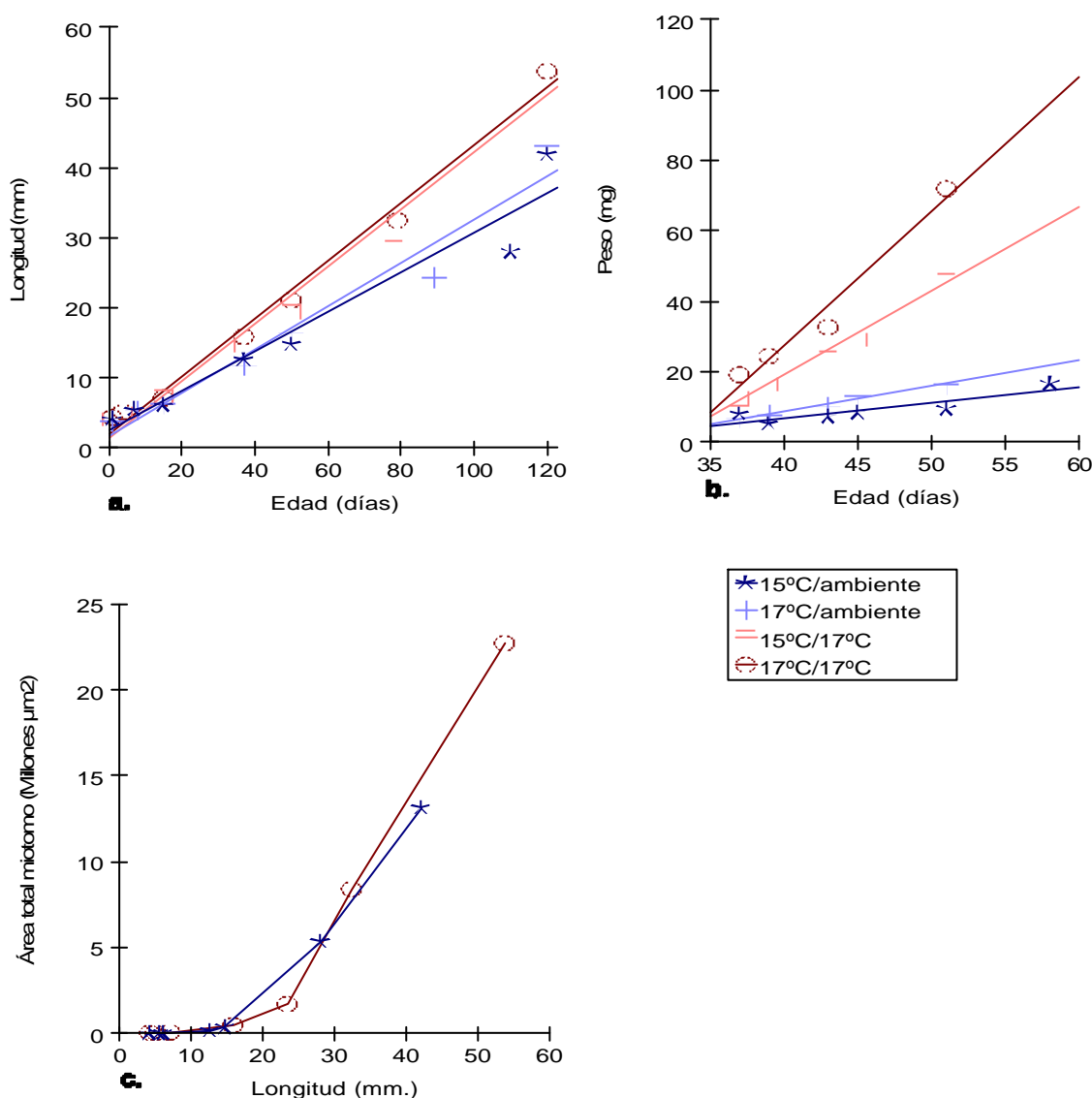


Fig. 22 (a-c). (a) Longitudes de las larvas de *D. labrax* desde la eclosión hasta los 120 días. Tras un ajuste lineal las ecuaciones obtenidas fueron: $L=2.04+0.27t$ ($r^2=0.94$) a 15 °C/ambiente (donde L es longitud, y t es días post-eclosión); $L=2.34+0.29t$ ($r^2=0.96$) a 17 °C/ambiente; $L=1.57+0.39t$ ($r^2=0.97$) a 15/17°C; $L=1.72+0.49t$ ($r^2=0.97$) a 17/17 °C. (b) La gráfica representa el peso alcanzado por las larvas de *D. labrax* desde los 37 hasta los 58 días. Tras un ajuste lineal las ecuaciones obtenidas fueron: $P=4.2+0.43t$ ($r^2=0.76$) a 15 °C/ambiente (donde P es peso, y t es días posteclosión); $P=4.15+0.73t$ ($r^2=0.98$) a 17 °C/ambiente; $P=5.06+2.4t$ ($r^2=0.99$) a 15/17°C; $P=4.6+3.8t$ ($r^2=0.97$) a 17/17 °C. (c) Evolución del área transversal del total del miotomo frente a la longitud a lo largo del desarrollo larvario y en la fase postlarvaria.

IV-3. CRECIMIENTO MUSCULAR Y DESARROLLO LARVARIOS DE *D. labrax* ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA: EXPERIMENTO 2° (1997).

Las combinaciones de T^aincubación/T^acultivo a las que se sometieron las larvas fueron las siguientes: $\cong 15$ °C/ambiente; $\cong 17$ °C/ambiente; $\cong 15$ °C/19°C y $\cong 17$ °C/19 °C

La temperatura ambiente fue inicialmente $\cong 15$ °C y aumentó gradualmente hasta el final del experimento (ver Fig. 8 de material y métodos).

Tal y como hemos hecho en el experimento anterior, las representaciones gráficas, así como el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Anova) se ha realizado considerando todas las combinaciones de temperatura conjuntamente.

Describimos a continuación el crecimiento absoluto o neto de los diferentes parámetros musculares.

IV-3.1. CRECIMIENTO MUSCULAR DE *D. labrax* ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA.

IV-3.1.1. FASES EMBRIONARIA Y PRELARVARIA.

En esta etapa incluimos dos estadios de desarrollo: la eclosión (final de la fase embrionaria), y la apertura de la boca (final de la fase prelarvaria).

IV-3.1.1.1. <i>D. labrax</i> ATLÁNTICA

A la **eclosión (día cero)**, las áreas transversales del *músculo blanco* y *del total del miotomo*, así como el *área* de las fibras blancas y rojas, son menores en los ejemplares incubados a 17 °C (Figs. 23a y 24a,b). La *tendencia* en el *número* de fibras (blancas y rojas), sin embargo, difiere de la que muestra el *área* de las fibras, apreciándose un

aumento de este parámetro a mayor temperatura de incubación (Fig. 24c,d). La temperatura, por tanto, influyó sobre los mecanismos de crecimiento (hipertrofia e hiperplasia fibrilares), aunque no llegaron a detectarse diferencias significativas.

La distribución de tamaños de las fibras blancas muestra una mayor proporción de fibras pequeñas ($<50\mu\text{m}^2$) a 17 °C de incubación que a 15 °C (Fig. 23c,d).

A la **apertura de la boca (4-6 días)**, las áreas transversales del *total del miotomo* y del *músculo blanco*, así como el *área de las fibras blancas* son significativamente mayores a 19 °C de cultivo ($p=0.000$ músculo blanco; $p=0.003$ área fibras blancas) (Figs. 23a y 24a). El *número* de fibras blancas permanece prácticamente invariable respecto a la eclosión, aunque detectamos una interacción $T^{\text{a}}\text{incubación} * T^{\text{a}}\text{cultivo}$ en los ejemplares de los tanques 15/19 °C y 17 °C/ambiente, que determina un aumento significativo de este parámetro (Fig. 24c).

El área transversal del *músculo rojo*, muestra también una interacción $T^{\text{a}}\text{inc.} * T^{\text{a}}\text{cult.}$, siendo la combinación más óptima 17 °C/ambiente ($p<0.05$) (Fig. 23b); y similar tendencia manifiesta el *área* de sus fibras, aunque no de forma significativa. El *número* de fibras rojas no aumenta respecto a la eclosión en los ejemplares incubados a 15 °C, y se observa una disminución en las larvas incubadas a mayor temperatura.

➤ A modo de resumen encontramos que, a la eclosión, la temperatura de incubación de 15 °C determina mayores valores del miotomo y del área de sus fibras que a 17 °C. Tras la eclosión, el **crecimiento** del miotomo se produce fundamentalmente por hipertrofia fibrilar, viéndose ésta influida significativamente por las altas temperaturas de **cultivo**.

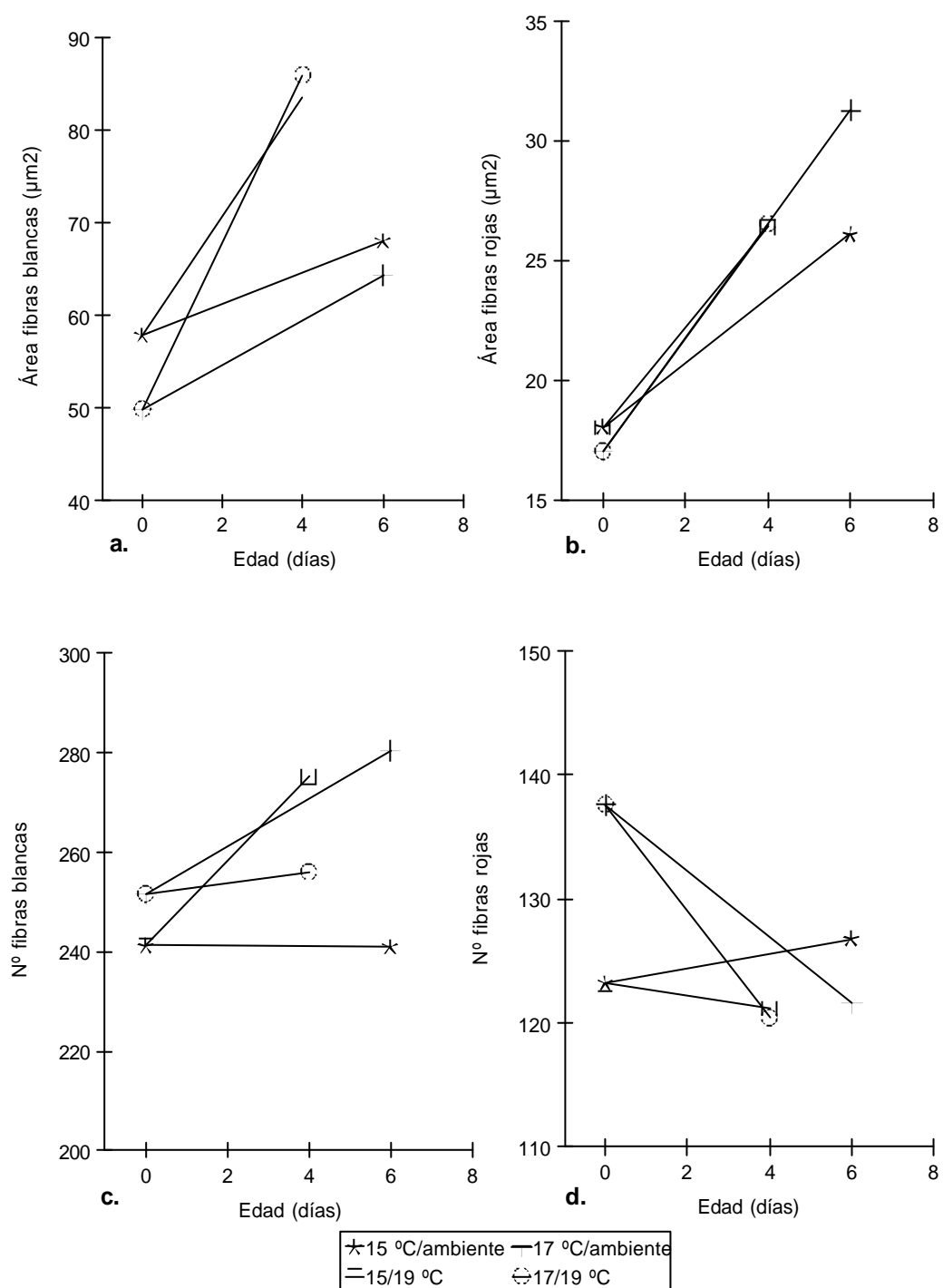


Fig. 24 (a-d). Área y número de fibras (blancas y rojas) de larvas de *D. labrax atlántica* a diferentes temperaturas, a la eclosión y a la apertura de la boca.

IV-3.1.1.2. *D. labrax* MEDITERRÁNEA

A la **eclosión (día cero)**, el *área* de las fibras blancas y rojas, así como las áreas transversales de los *músculos blanco y rojo* del miotomo son significativamente mayores en los ejemplares incubados a 17 °C ($p=0.022$ músculo blanco; $p=0.000$ área fibras blancas) (Fig. 25 a-d).

El *número* de fibras blancas es ligeramente mayor a alta temperatura de incubación, pero no de forma significativa; el número de fibras rojas no se ve influido por la temperatura (Fig. 25 e,f).

Desde la eclosión hasta la **apertura de la boca (3-6 días)**, acontece una hipertrofia de las fibras blancas y rojas respecto a la eclosión, no detectándose diferencias entre los tanques experimentales por efecto de la temperatura (Fig. 25c,d).

El *número* de fibras (blancas y rojas) prácticamente no aumenta respecto a la eclosión, e incluso puede apreciarse una disminución acusada de este parámetro en el tanque 17/19 °C (Fig. 25e,f). El análisis estadístico pone de manifiesto un efecto negativo de las altas temperaturas de incubación sobre el número de fibras rojas (Anova, $p=0.039$).

Las áreas transversales de los *músculos blanco y rojo* al final de la fase prelarvaria (apertura de la boca) son mayores que a la eclosión, y similares a todas las temperaturas (Fig. 25a,b).

➤ En resumen, a la eclosión, el área transversal del miotomo y el área de sus fibras son significativamente mayores a 17 °C de incubación que a 15 °C. El **crecimiento** del miotomo desde la eclosión hasta la apertura de la boca se produce únicamente por hipertrofia fibrilar, no detectándose hiperplasia de las fibras en este momento.

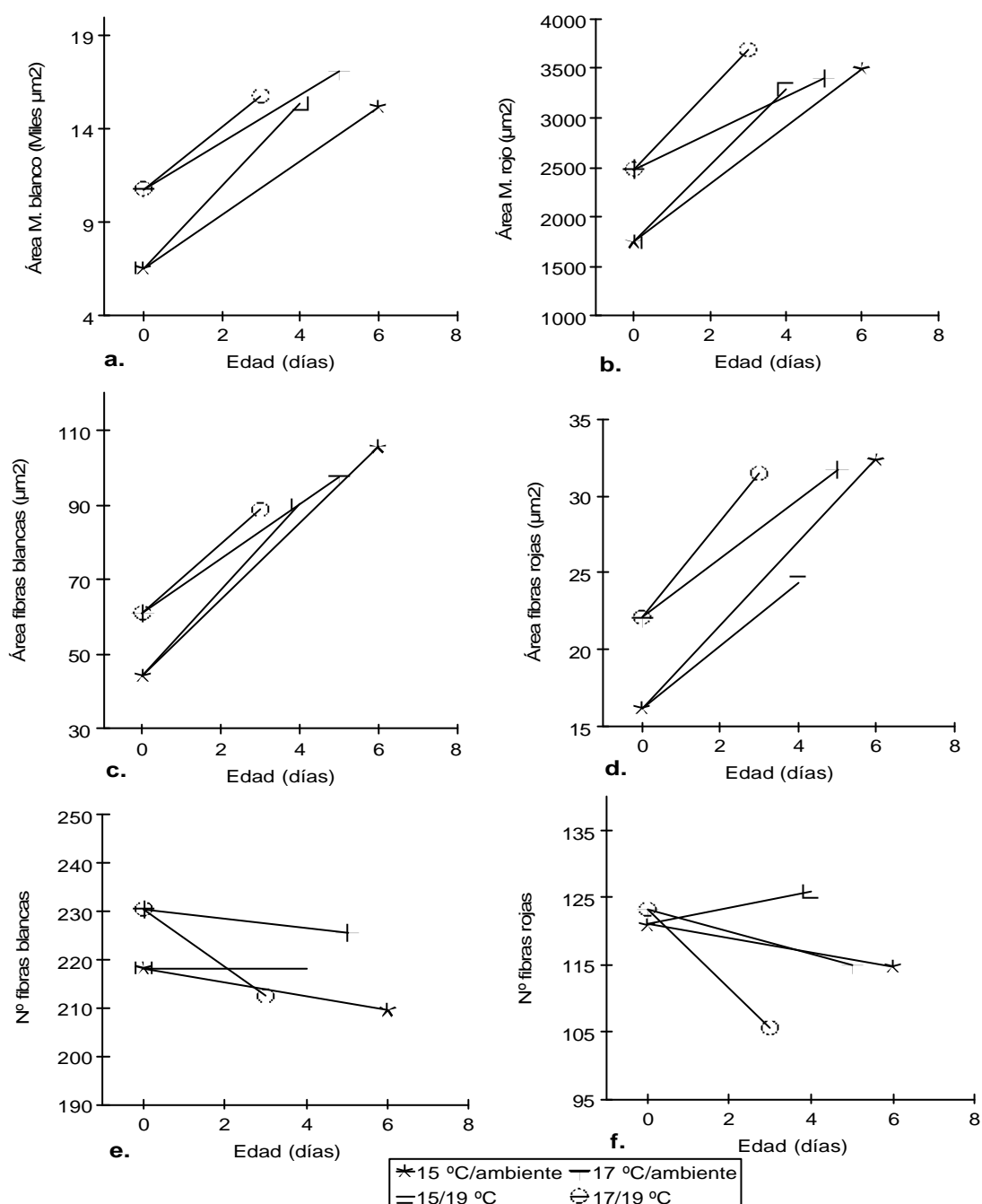


Fig. 25 (a-f). (a,b) Área transversal de los músculos blanco y rojo, y área y número de las fibras blancas y rojas (c-f) en larvas de *D. labrax mediterranea* a la eclosión y a la apertura de la boca, bajo diferentes condiciones de temperatura.

IV-3.1.1.3. COMPARACIÓN *D. labrax* ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA

En este apartado se realiza un análisis conjunto del comportamiento descrito por ambas poblaciones de *D. labrax* atlántica y mediterránea a la eclosión y a la apertura de la boca (Figs. 23-25), y Fig. 26.

El crecimiento total o global del miotomo muestra un comportamiento similar al que manifiesta el área de sus fibras, tanto en *D. labrax* atlántica como en *D. labrax* mediterránea. No obstante, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento muscular es diferente entre ambas poblaciones de *D. labrax*. Así, a la **eclosión**, el crecimiento del miotomo de *D. labrax atlántica* se ve incrementado en larvas incubadas a bajas temperaturas, que presentan a su vez, mayor área fibrilar que los ejemplares incubados a alta temperatura. Las larvas de *D. labrax mediterránea*, por el contrario, se muestran positivamente influidas por las altas temperaturas de incubación, de tal forma que, a la eclosión, el área transversal del miotomo y el área de sus fibras están incrementados en las larvas incubadas a 17 °C. Por tanto, la influencia de la temperatura de incubación sobre el crecimiento del miotomo y del área de sus fibras es diferente entre ambas poblaciones de *D. labrax* (interacción significativa origen poblacional* T^a incubación para el área de las fibras blancas, $p=0.001$; y para el área transversal del músculo blanco y del total del miotomo, $p=0.013$).

Tras la eclosión y hasta la apertura de la boca, el músculo blanco en larvas de *D. labrax* atlántica y mediterránea aumenta paralelamente al incremento del área de sus fibras, y la temperatura actúa significativamente sobre este parámetro en prelarvas de *D. labrax* atlántica, no observándose dicha influencia sobre *D. labrax* mediterránea. El análisis estadístico pone de manifiesto de nuevo una interacción significativa origen* T^a cultivo para el área de las fibras blancas ($p=0.003$) y el área transversal del músculo blanco ($p=0.000$) durante la fase prelarvaria.

Por otro lado, si comparamos el crecimiento que alcanzan los ejemplares de cada población de *D. labrax* (independientemente del efecto de la temperatura sobre cada tanque experimental), se pone de manifiesto que, al final de la fase prelarvaria (apertura de la boca), el número de fibras blancas es significativamente mayor en los ejemplares de *D.*

labrax atlántica (Fig. 26f) que en *D. labrax* mediterránea; esta última población, sin embargo, presenta valores significativamente mayores en el área de las fibras blancas que los ejemplares de *D. labrax* atlántica (Fig. 26d)

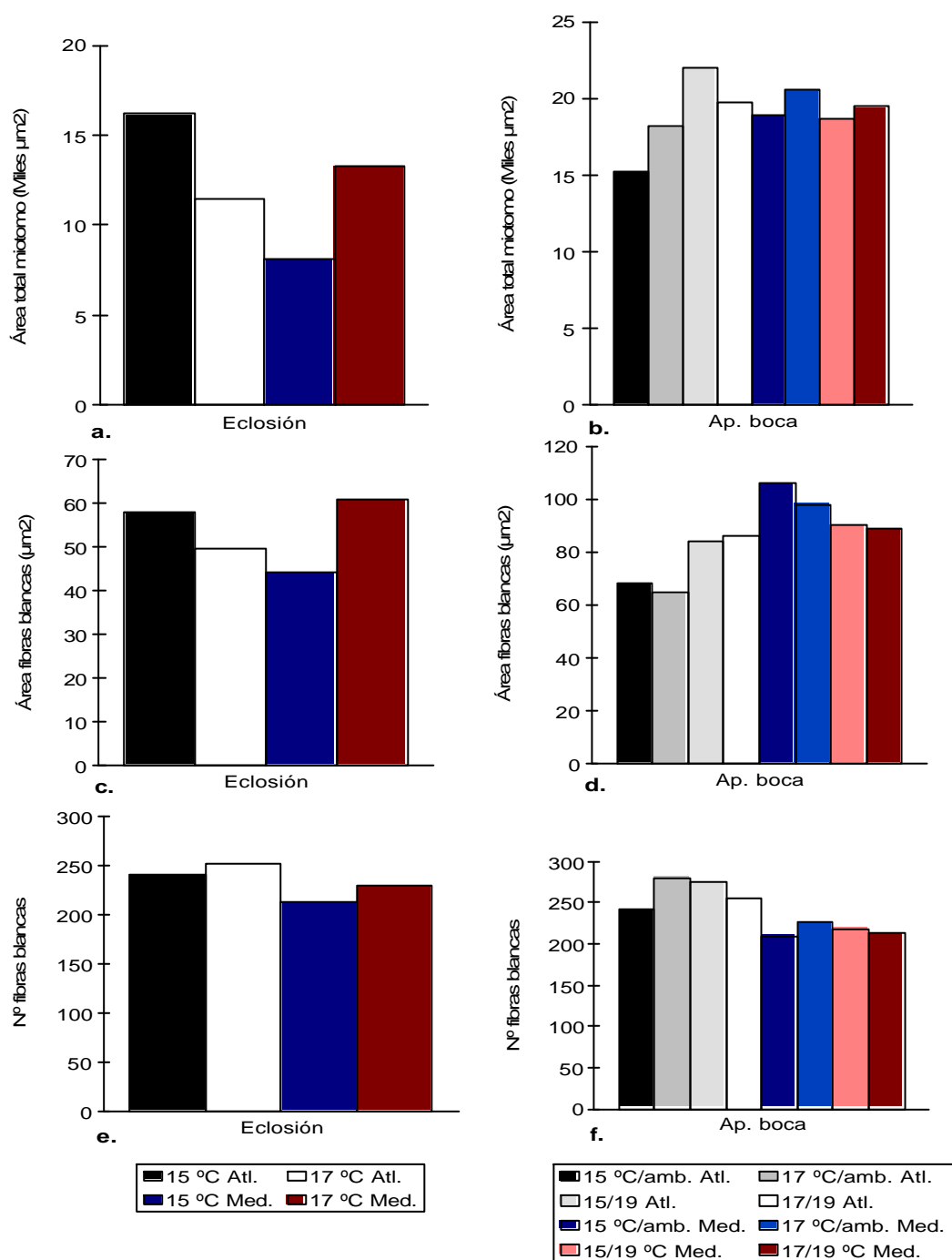


Fig. 26 (a-f). Área total del miotomo, área y número de fibras blancas de larvas de *D. labrax* atlántica (Atl.) y mediterránea (Med.) a la eclosión y a la apertura de la boca.

IV-3.1.2. FASE LARVARIA.

Tras la apertura de la boca y la reabsorción del saco vitelino, comienza la etapa larvaria. El estudio de este período lo dividimos en 2 apartados: desde los 20 días hasta el comienzo del destete (48-55 días); y final de la metamorfosis larvaria (escamación).

IV-3.1.2.1. DESDE LOS 20 DÍAS HASTA EL COMIENZO DEL DESTETE (48-55 DÍAS).

Se describen los resultados separando el efecto de la temperatura de cultivo del efecto producido por la temperatura de incubación, con el fin de facilitar la comprensión de la influencia de ambas variables sobre el crecimiento muscular. Para estudiar el efecto de la temperatura de cultivo se comparan ejemplares que, habiendo sido incubados a una misma temperatura, fueron cultivados tras la eclosión a diferentes temperaturas (15 °C/ambiente frente a 15/19 °C; y 17 °C/ambiente frente a 17/19 °C). Por su parte, el efecto de la temperatura de incubación lo estudiamos comparando ejemplares cultivados a una misma temperatura tras la eclosión, pero incubados a diferente temperatura (15 °C/ambiente frente a 17 °C/ambiente; y 15/19 °C frente a 17/19 °C). No obstante, tal y como hemos hecho anteriormente, las representaciones gráficas, así como el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Anova) se ha realizado considerando todas las combinaciones de temperatura conjuntamente.

IV-3.1.2.1.1. <i>D. labrax</i> ATLÁNTICA

Efecto de la temperatura de cultivo (Fig. 27 a-d).

A los **20 días**, todos los *parámetros musculares* medidos son mayores en las larvas cultivadas a altas temperaturas. La Anova refleja que este efecto de la temperatura de cultivo es significativo para todos ellos, excepto para el área de las fibras rojas. A su vez, el efecto de la temperatura de cultivo a esta edad fue más significativo sobre el número de fibras blancas ($p=0.003$) que sobre el área fibrilar ($p=0.044$).

A los **48 días** (inicio del destete), las áreas transversales de los *músculos blanco y rojo*, son significativamente mayores en larvas cultivadas a 19 °C (Anova, $p < 0.05$), particularmente en el tanque 15/19 °C según revela el test de Tukey. Este resultado se complementa con la distribución de tamaños fibrilares, que muestra que la mayor proporción de fibras blancas pequeñas ($< 100 \mu\text{m}^2$) la presentan los ejemplares de dicho tanque (Fig. 27e,f), lo que se corresponde con la aparición de fibras de nueva generación.

Efecto de la temperatura de incubación (Fig. 27 a-d).

Durante estas fases, la temperatura de incubación no ejerció un efecto significativo. No obstante, la tendencia observada fue la siguiente:

En *larvas cultivadas a altas temperaturas* el valor de los parámetros musculares fue mayor, en general, si las larvas habían sido previamente incubadas a menor temperatura (15 °C).

En *larvas cultivadas a temperatura ambiente* no se define una tendencia clara. Así, el número de fibras blancas y rojas, a los 20 días, es mayor en larvas previamente incubadas a menor temperatura, mostrando la tendencia contraria a los 48 días.

➤ Por lo tanto, el **crecimiento** muscular en la fase larvaria es muy intenso y se ve estimulado de forma significativa por las altas temperaturas de cultivo. Se pone de manifiesto una alta contribución hipertrófica e hiperplásica al total del miotomo, que presenta, en general, una correlación positiva con las altas temperaturas de cultivo. Por su parte, la temperatura de incubación no muestra un efecto significativo en este período.

IV-3.1.2.1.2. <i>D. labrax</i> MEDITERRÁNEA

Efecto de la temperatura de cultivo (Figs. 28, 29).

A los **20 días**, todos los parámetros musculares son significativamente mayores a 19 °C de cultivo (Anova, $p < 0.05$), excepto el área de fibras rojas, que no muestra una tendencia definida ante las diferentes temperaturas.

A los **55 días** (inicio del destete) las áreas transversales de los *músculos blanco y rojo*, así como el *número de fibras blancas y rojas*, son significativamente mayores en larvas cultivadas a altas temperaturas ($p = 0.005$ músculo blanco; $p = 0.008$ número de fibras blancas). Los histogramas reflejan el mayor porcentaje de fibras pequeñas blancas y rojas ($< 100 \mu\text{m}^2$) a 19 °C, lo que se corresponde con una gran generación de fibras a altas temperaturas de cultivo (Fig. 29 a-d).

El *área de las fibras blancas y rojas* es mayor a 19 °C de cultivo, aunque no de forma significativa.

Efecto de la temperatura de incubación (Figs. 28, 29):

La temperatura de incubación no influyó de forma significativa sobre el crecimiento muscular en estos estadíos. No obstante, se observa la siguiente tendencia en los diferentes tanques experimentales:

A los 20 días, no se observa una tendencia constante en el comportamiento de los diferentes parámetros musculares frente a la temperatura de incubación. A los 55 días se aprecia que *en larvas cultivadas a altas temperaturas*, el área transversal de los músculos blanco y rojo es mayor si previamente se incubaron a baja temperatura (15 °C). Sin embargo, *en larvas cultivadas a temperatura ambiente*, el crecimiento de las áreas transversales fue mayor ante altas temperaturas de incubación (17 °C).

➤ En resumen, a lo largo de estas fases se evidencia un fuerte **crecimiento** del miotomo, que tiene lugar tanto por hipertrofia como por hiperplasia fibrilares, viéndose ambos fenómenos influidos positivamente por las altas temperaturas de cultivo. No se define, sin embargo, un efecto significativo de las altas temperaturas de incubación sobre el crecimiento muscular.

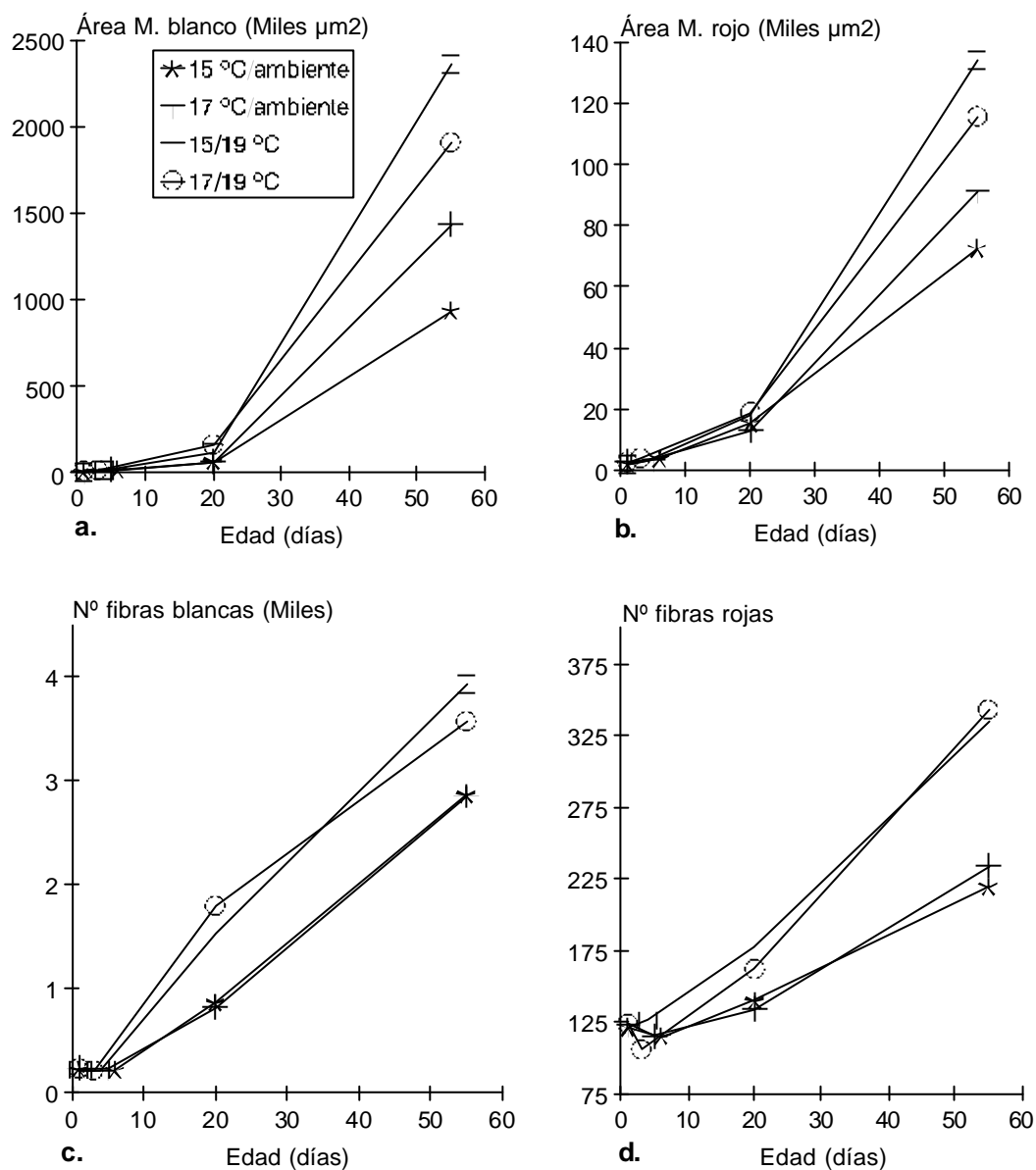


Fig. 28 (a-d). Influencia de la temperatura sobre el área transversal de los músculos blanco y rojo (a,b), y sobre el número de fibras blancas y rojas (c,d) de larvas de *D. labrax mediterranea* desde la eclosión hasta el inicio del destete.

IV-3.1.2.1.3. COMPARACIÓN *D. labrax* ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA (FIGS. 27-29)

En esta etapa, el crecimiento del miotomo en ambas poblaciones de *D. labrax* es significativamente mayor que en estadios prelarvarios ($p=0.000$). El tratamiento estadístico de los resultados, considerando las dos poblaciones conjuntamente, refleja un efecto global de la **temperatura de cultivo** sobre el crecimiento del miotomo de las larvas a lo largo de estos estadios; de tal manera que, las altas temperaturas de cultivo aumentan significativamente las áreas transversales del miotomo, tanto en *D. labrax* atlántica como en *D. labrax* mediterránea.

El crecimiento del miotomo se produce por hipertrofia e hiperplasia fibrilares, viéndose la generación de fibras más significativamente influida por las altas temperaturas de cultivo que la hipertrofia fibrilar. Esto se manifiesta en el análisis estadístico aplicado sobre ambos parámetros, que revela niveles de significación mayores para el número de fibras blancas que para el área de las mismas, tanto en *D. labrax* atlántica como en *D. labrax* mediterránea.

La correlación positiva de las altas temperaturas de cultivo sobre la hiperplasia fibrilar va asociada a un rápido crecimiento del miotomo. Esto se observa en los histogramas, en los que aparece un gran número de fibras de pequeño tamaño al inicio del destete, correspondientes a fibras de nueva generación.

La **temperatura de incubación** no influyó significativamente en el crecimiento miotomal durante estas fases. No obstante, al comienzo del destete, se aprecia cierta interacción $T^{\text{a incubación}} * T^{\text{a cultivo}}$, que, aunque no llega a ser significativa, pone de manifiesto la existencia de combinaciones de temperatura, cuyos efectos son diferentes de los que se derivarían de considerar la influencia de ambas variables por separado. Así, observamos que la temperatura de incubación no influye de igual forma en ejemplares posteriormente cultivados a altas temperaturas, que en larvas cultivadas a temperatura ambiente: en larvas cultivadas a 19 °C, el área transversal de los músculos blanco y rojo es mayor a 15/19 °C que a 17/19 °C; sin embargo, en larvas cultivadas a temperatura ambiente, se observa cierta tendencia a aumentar el valor de sus parámetros musculares, cuando han sido incubadas previamente a altas temperaturas, siendo esto último más manifiesto en *D. labrax* mediterránea que en *D. labrax* atlántica.

De acuerdo con los resultados descritos, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento muscular fue similar en ambas poblaciones de *D. labrax*. No obstante, los ejemplares de *D. labrax* mediterránea alcanzaron en esta etapa un crecimiento significativamente mayor que los ejemplares de *D. labrax* atlántica, en todos los parámetros musculares excepto en el número de fibras blancas, que presentó valores similares entre ellas.

IV-3.1.2.2. ESCAMACIÓN (FIN DE LA METAMORFOSIS).

IV.3.1.2.2.1. *D. labrax* ATLÁNTICA.

La escamación se produce antes en los ejemplares sometidos a mayor temperatura de cultivo. Así, acontece a los 52 días a 19 °C de cultivo, y a los 71 días a temperatura ambiente. En este estadio, por tanto, comparamos ejemplares de diferentes edades, pero con una madurez biológica equiparable.

La Fig. 30 representa el crecimiento muscular alcanzado al final de la metamorfosis en todos los tanques experimentales. El análisis estadístico de los resultados encontrados en este estadio de desarrollo, pone de manifiesto que la temperatura de cultivo y de incubación interaccionan entre sí, por lo que describimos conjuntamente el efecto de ambas variables sobre el crecimiento.

Las áreas transversales de los *músculos blanco y total del miotomo* (Fig. 30a), son significativamente mayores a 19 °C de cultivo (Anova, $p=0.025$) si bien estas diferencias se manifiestan principalmente respecto a las larvas mantenidas a 15 °C/ambiente. En este sentido, la aplicación del test de Tukey sólo revela diferencias entre 15 °C/ambiente y 17/19 °C ($p=0.051$, valor ligeramente superior al nivel de confianza establecido como estadísticamente significativo). El área transversal del *músculo rojo* (Fig. 30b) muestra el mayor valor a 17 °C/ambiente, pero el análisis estadístico no revela diferencias significativas con el resto de combinaciones de temperatura.

El *área de las fibras blancas* (Fig. 30c) manifiesta una interacción de la temperatura de incubación con la temperatura de cultivo ($p=0.002$), que revela la combinación 17 °C/ambiente como la más óptima. El test de Tukey manifiesta que estos

valores a 17 °C/ambiente son significativamente mayores a los hallados a 15 °C/ambiente y a 17/19 °C. Similar tendencia muestra el *área de las fibras rojas* (Fig. 30d) aunque no de forma significativa.

El *número* de fibras blancas (Fig. 30e) es mayor a 19 °C de cultivo ($p=0.001$). El test de Tukey muestra que el número de fibras blancas a 15 °C/ambiente es significativamente menor que el de los ejemplares cultivados a 19 °C. El número de fibras rojas (Fig. 30f) muestra también un ligero incremento en los ejemplares cultivados a altas temperaturas, pero no de forma significativa.

La distribución de tamaños fibrilares (Fig. 31) presenta un alto porcentaje de fibras blancas pequeñas ($<100\mu\text{m}^2$) en todos los tanques experimentales, excepto a 15 °C/ambiente (Fig. 31c). A su vez, dicho porcentaje, correspondiente con la aparición de fibras de nueva generación, es ligeramente mayor en larvas cultivadas a 19 °C. En el músculo rojo se aprecia una alta proporción de fibras pequeñas ($<50\mu\text{m}^2$) a todas las temperaturas (Fig. 31d-f), siendo ligeramente mayor en larvas cultivadas a 19 °C.

➤ A modo de resumen, al final de la metamorfosis larvaria, el miotomo presenta una constitución fibrilar que muestra la siguiente dependencia de la temperatura: el número de fibras blancas está positivamente correlacionado con la temperatura de cultivo, mientras que el área de las fibras se influye por una interacción $T^{\text{a}}\text{inc.} * T^{\text{a}}\text{cultivo}$, que manifiesta la combinación 17 °C/ambiente como la más óptima.

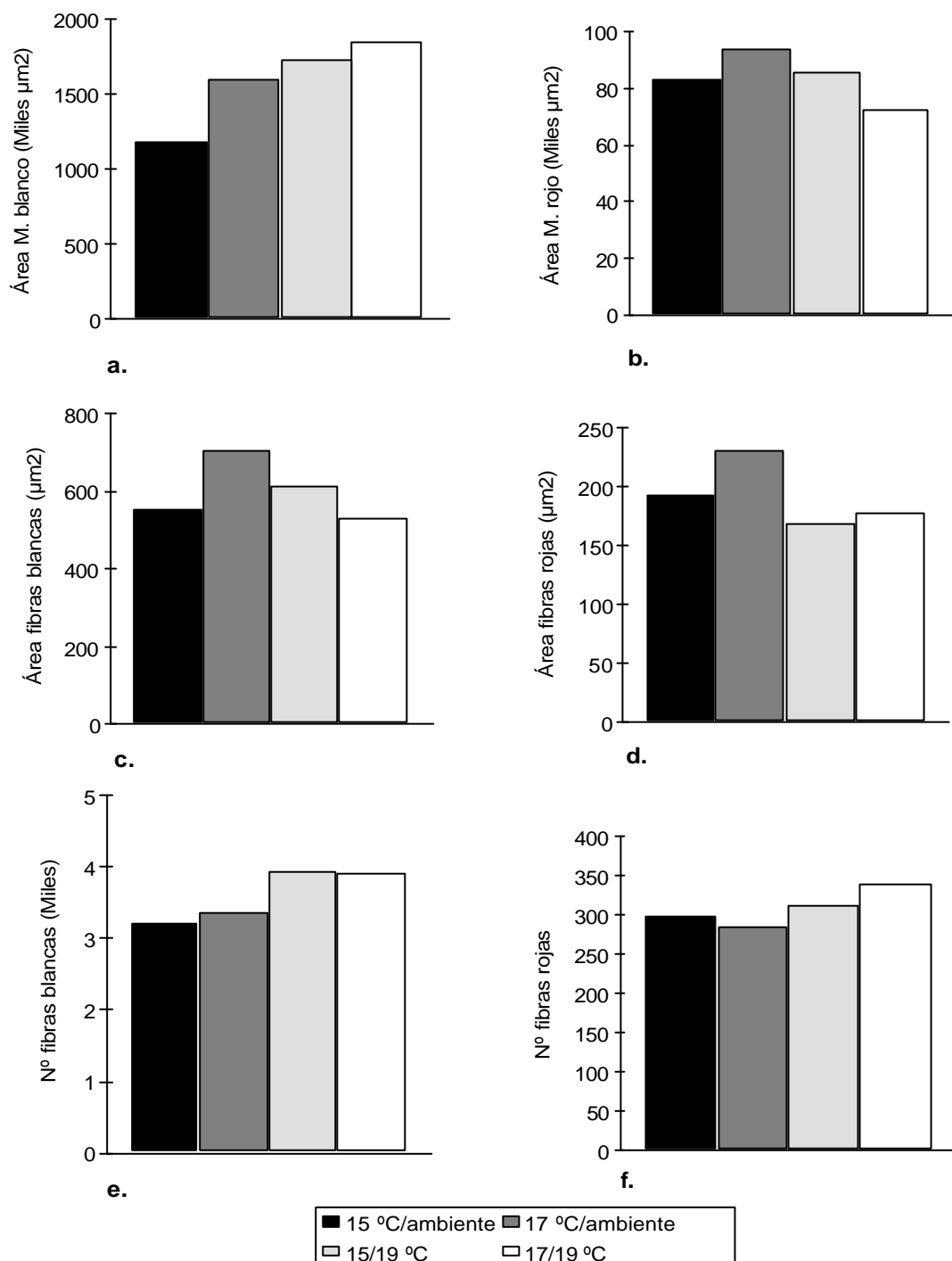


Fig. 30 (a-f). Efecto de la temperatura sobre las áreas transversales de los músculos blanco y rojo (a,b), y sobre la hipertrofia e hiperplasia fibrilares (c-f) al final de la metamorfosis larvaria en *D. labrax atlantica*.

IV.3.1.2.2.2 *D. labrax* MEDITERRÁNEA.

Los ejemplares cultivados a altas temperaturas finalizaron la metamorfosis (escamación) a los 52 días, mientras que las larvas cultivadas a temperatura ambiente completaron este estadio de desarrollo a los 67 días (17 °C/ambiente) y a los 73 días (15 °C/ambiente).

La Fig. 32 representa el valor de los parámetros musculares en las diferentes combinaciones de temperatura. Al igual que en *D. labrax* atlántica, los resultados hallados en *D. labrax* mediterránea manifiestan interacciones entre la temperatura de cultivo y de incubación, por lo que describimos el efecto de ambas variables conjuntamente.

Las áreas transversales de los *músculos blanco y total del miotomo* presentan el mayor valor en las larvas mantenidas a 17 °C/ambiente, lo que refleja una interacción significativa $T^{ainc} * T^{acultivo}$ ($p=0.019$) (Fig. 32a). El *músculo rojo* también mostró esta misma tendencia, pero no de forma significativa (Fig. 32b).

El *área de las fibras blancas* manifiesta también una interacción $T^{ainc} * T^{acultivo}$ ($p=0.049$), lo que se refleja en las larvas sometidas a la combinación de temperatura 17 °C/ambiente, que alcanzan el mayor valor en este parámetro (Fig. 32c). La aplicación del test de Tukey a estos resultados revela que el área de las fibras blancas a 17 °C/ambiente es significativamente mayor que el valor que presenta este parámetro en larvas cultivadas a 19 °C. El *área de las fibras rojas* no reveló diferencias significativas (Fig. 32d).

El *número de fibras blancas y rojas* no muestra diferencias significativas entre los tanques de cultivo (Fig. 32e,f).

Los histogramas de tamaños fibrilares muestran un alto porcentaje de fibras pequeñas blancas ($<100\mu m^2$) a todas las temperaturas, si bien es ligeramente mayor en larvas cultivadas a mayor temperatura (Fig. 33a-c).

El porcentaje de fibras pequeñas rojas ($<100\mu m^2$) es elevado en todos los tanques experimentales, excepto a 15 °C/ambiente (Fig. 33d-f).

➤ En resumen, al final del desarrollo larvario (escamación), el crecimiento del miotomo y de las fibras musculares se ve influido por la temperatura de la siguiente forma: el área total del miotomo y el área de las fibras blancas manifiestan una interacción

significativa $T^{inc.} * T^{cul.}$ que es óptima en la combinación 17 °C/ambiente. Por su parte, el número de fibras no se mostró significativamente influido por la temperatura en este momento.

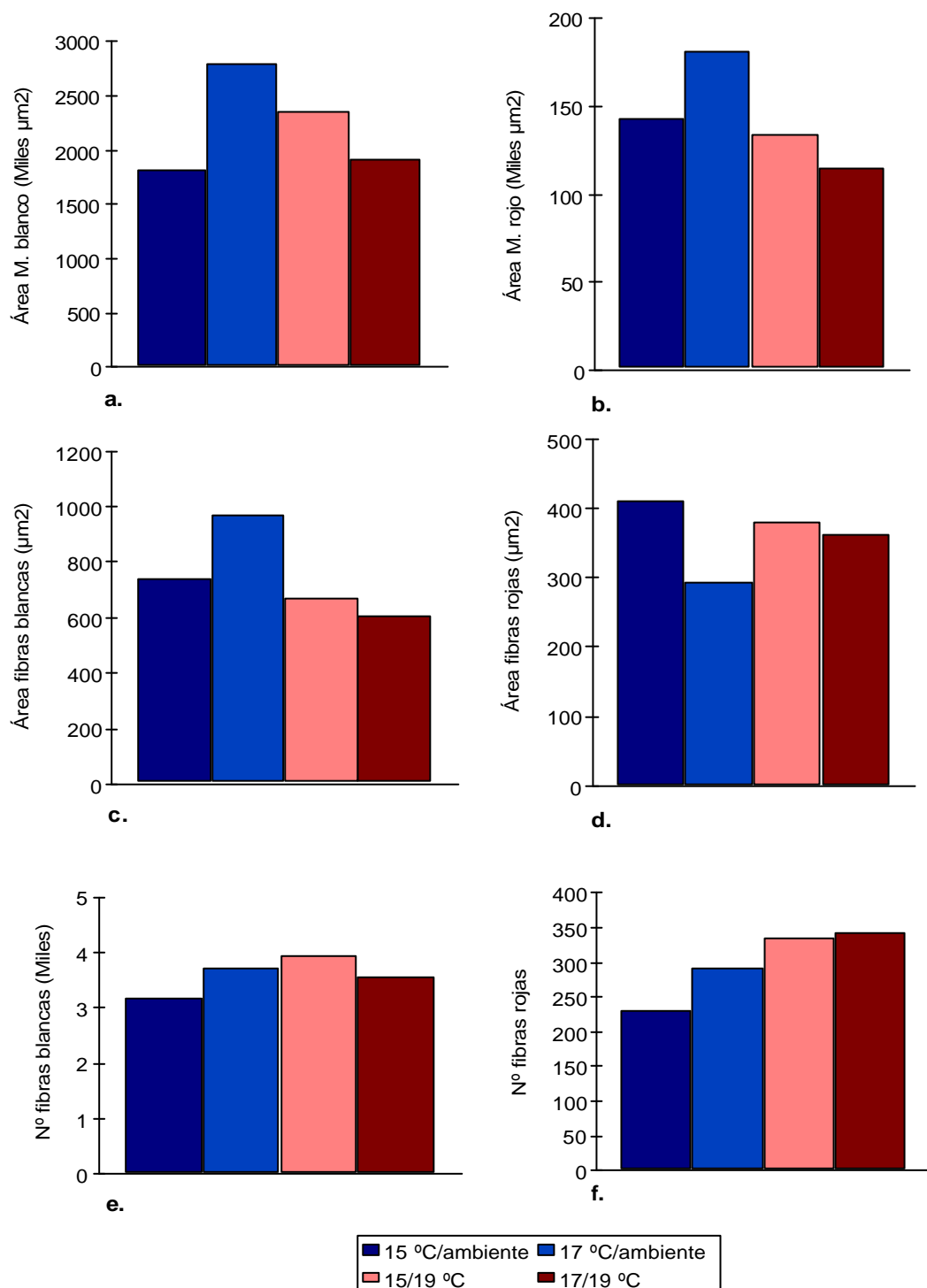


Fig. 32 (a-f). Efecto de la temperatura sobre las áreas transversales de los músculos blanco y rojo (a,b), y sobre las fibras blancas y rojas (c-f) al final de la metamorfosis larvaria en *D. labrax mediterránea*.

IV-3.1.2.2.3. COMPARACIÓN <i>D. labrax</i> ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA

Como ya se ha descrito, se observa una **interacción T^aincubación*T^acultivo** sobre el *área de las fibras blancas* en *D. labrax* atlántica y mediterránea, mostrando la combinación más óptima de temperaturas para este parámetro a 17 °C/ambiente (Fig. 34b). Esta interacción T^ainc.*T^acult. se observa también en el *área total del miotomo*, aunque de forma significativa sólo en *D. labrax* mediterránea (Fig. 34a).

Es importante conocer la existencia de estas interacciones, ya que pone de manifiesto que hay combinaciones de temperatura (T^ainc./T^acult.) que pueden resultar ventajosas o idóneas para el crecimiento, o, por el contrario, provocar efectos negativos o adversos.

La **temperatura de cultivo** determina diferencias significativas en el *número* de fibras blancas y en las áreas transversales de los *músculos blanco y total* en larvas de *D. labrax* atlántica cultivadas a altas temperaturas, pero este efecto no se observó en *D. labrax* mediterránea (Fig. 34a,c).

Por tanto, la respuesta frente a la temperatura de cultivo, al final del desarrollo larvario, es diferente entre ambas poblaciones de *D. labrax*.

Estos resultados muestran un efecto de la temperatura de cultivo menos manifiesto que en las fases de crecimiento anteriores, de tal forma, que éste sólo es significativo en determinados casos. Esto se corresponde con el siguiente hecho: mientras en los estadios anteriores comparábamos ejemplares con una misma edad cronológica, en el presente estadio hemos seguido un criterio de desarrollo, comparando ejemplares con una misma edad fisiológica (fin de la metamorfosis), la cual se alcanzó antes a altas temperaturas de cultivo. Por tanto, consideramos que la temperatura de cultivo produce durante la fase larvaria un efecto acelerador del crecimiento muscular, más que un efecto neto sobre el crecimiento total alcanzado al final del desarrollo larvario.

Por otra parte, el crecimiento muscular al final de la metamorfosis larvaria fue significativamente mayor en *D. labrax* mediterránea que en *D. labrax* atlántica, excepto en el número de fibras blancas y rojas, que fue similar entre ellas (Fig. 34).

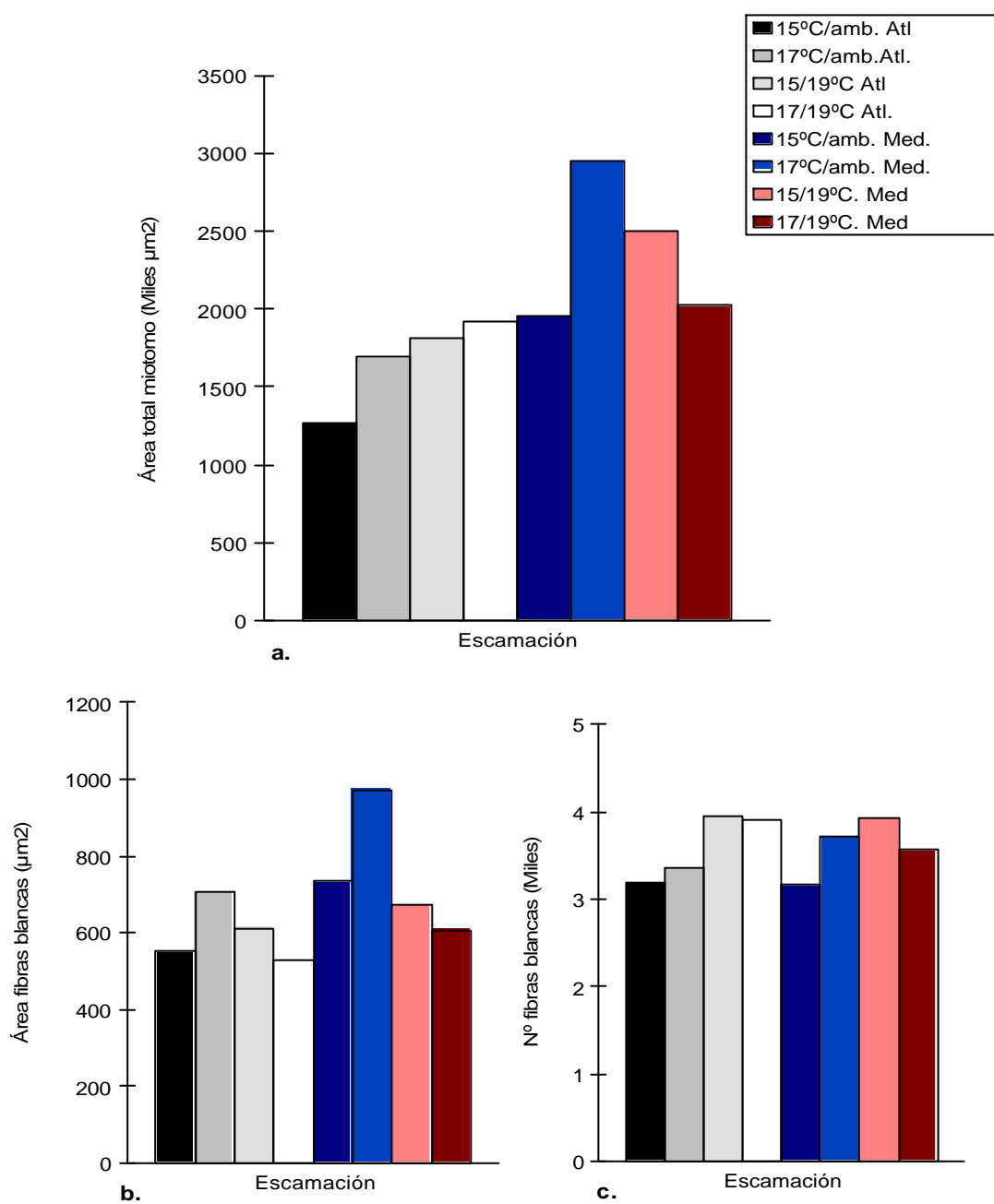


Fig. 34 (a-c). Área total del miotomo, área y número de fibras blancas de larvas de *D. labrax atlántica* (Atl.) y *D. labrax mediterránea* (Med.) al final del desarrollo larvario (escamación).

IV-3.1.3. FASE POSTLARVARIA: 90 DÍAS.

En este estadio sólo se han medido los parámetros del músculo blanco. Este período lo vamos a tratar conjuntamente en *D. labrax atlántica* y *mediterránea*, dado que la respuesta del crecimiento muscular frente a la temperatura fue similar en ambas poblaciones.

Las altas temperaturas de cultivo (19 °C) aumentaron significativamente *todos los parámetros del músculo blanco* en *D. labrax mediterránea* (Anova, $p < 0.05$). El mismo efecto se detectó en *D. labrax atlántica*, aunque no de forma significativa para el área de las fibras blancas. Estos resultados definen una clara tendencia en postlarvas cultivadas a altas temperaturas, pero debemos considerarlos de modo orientativo, ya que el tratamiento estadístico de los parámetros medidos en este estadio se realizó a partir de un reducido número de ejemplares (2-4 ejemplares/tanque de cultivo). Además, hay que tener en cuenta que a los 90 días, no todas las larvas tienen la misma edad fisiológica, ya que las cultivadas a 19 °C finalizaron su metamorfosis 15-20 días antes que las larvas cultivadas a temperatura ambiente.

La Fig. 35 muestra la influencia de la temperatura sobre el área transversal del músculo blanco al final del desarrollo larvario y a los 90 días.

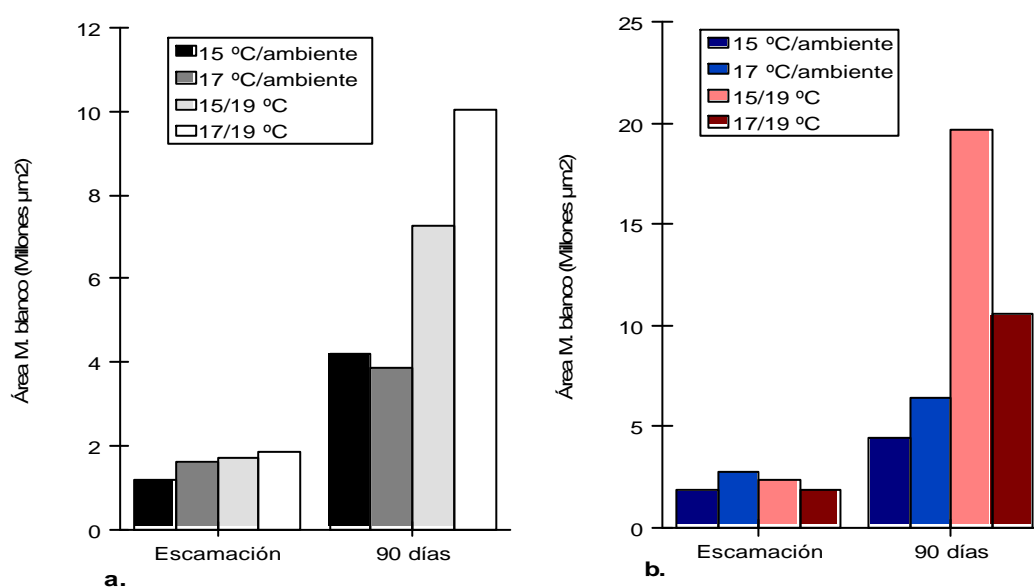


Fig. 35 (a,b). Crecimiento del área transversal del músculo blanco de *D. labrax atlántica* (a) y *mediterránea* (b), al final de la metamorfosis (escamación) y a los 90 días.

IV-3.2. PORCENTAJES DE MÚSCULO BLANCO Y ROJO RESPECTO AL TOTAL DEL MIOTOMO.

La proporción de músculo rojo respecto al total del miotomo, tanto en *D. labrax atlántica* como en *mediterránea*, es mayor en los primeros estadios de desarrollo larvario (Fig. 36). A partir de los 20 días comienza a disminuir, estabilizándose al comienzo del destete, cuando alcanza de forma permanente valores mínimos.

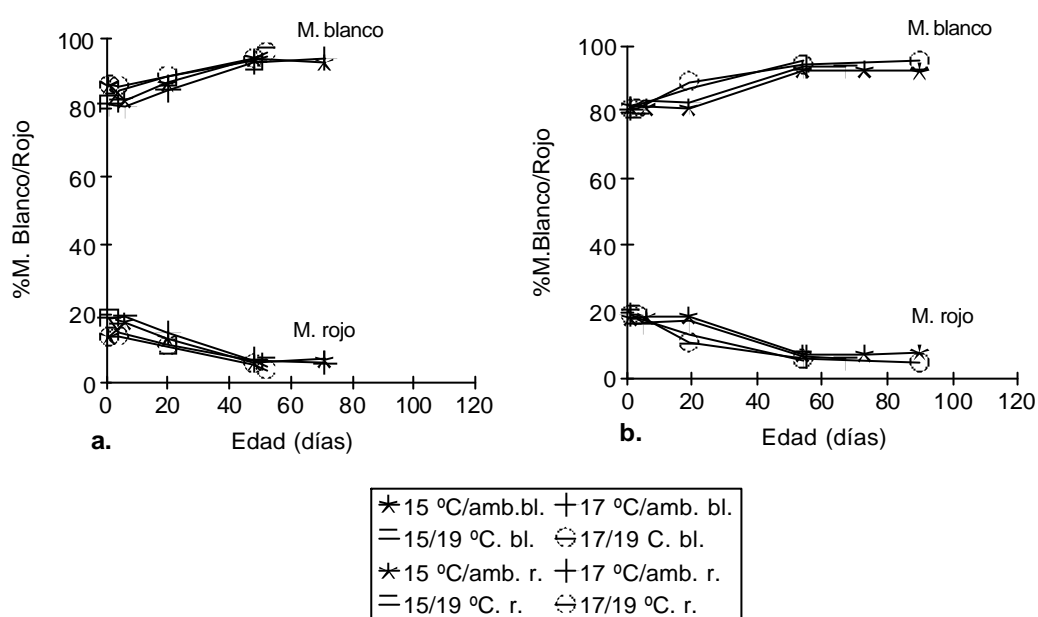


Fig 36 (a,b). Porcentaje de músculo blanco (bl.) y rojo (r.) respecto al total del miotomo a lo largo del desarrollo larvario en *D. labrax atlántica* (a) y *mediterránea* (b).

IV-3.3. TASAS DE CRECIMIENTO MUSCULAR Y DESARROLLO

IV-3.3.1. TASAS DE CRECIMIENTO MUSCULAR

Las Figs. 37 y 38 muestran la tasa de crecimiento muscular (incremento diario) a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo larvario (fases embrionaria, prelarvaria y larvaria). Describimos, a continuación, la tendencia observada en el área y número de las fibras blancas, así como en el área total del miotomo, en larvas de *D. labrax* atlántica y mediterránea sometidas a diferentes temperaturas.

IV-3.3.1.1. *D. labrax* ATLÁNTICA

O FASES EMBRIONARIA Y PRELARVARIA.

El *área de las fibras blancas* muestra una elevada tasa de crecimiento durante la fase embrionaria en los ejemplares de todos los tanques experimentales, no observándose una influencia de la temperatura de incubación sobre este parámetro (Fig. 37a). Durante la fase prelarvaria disminuye la tasa hipertrófica en todos los tanques experimentales, pero fundamentalmente en los cultivados a temperatura ambiente.

Durante el período embrionario la tasa *hiperplásica* es elevada, y se ve modificada por la temperatura de incubación, de tal forma que, a la eclosión, la tasa de generación de fibras es mayor a 17 °C de incubación que a 15 °C (Fig. 37b). En la fase prelarvaria, sin embargo, se aprecia una disminución muy acentuada de la producción diaria de fibras a todas las temperaturas.

La tasa de crecimiento del *total del miotomo* manifiesta una tendencia similar a la descrita por el área de las fibras blancas: es elevada a la eclosión (y no presenta influencia de la temperatura), y disminuye durante la fase prelarvaria, principalmente en los ejemplares cultivados a temperatura ambiente (Fig. 37c).

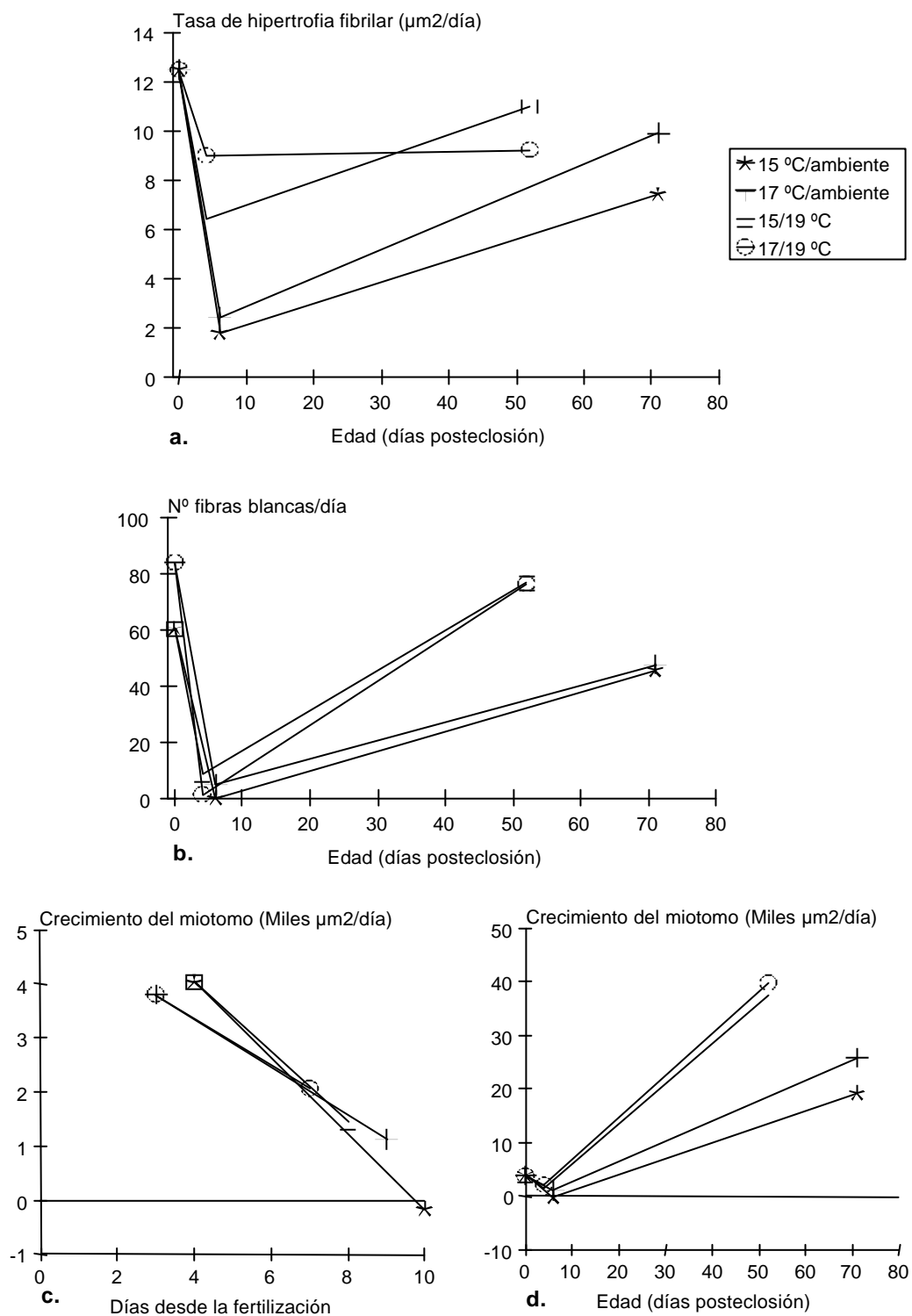


Fig. 37 (a-d). Tasas de crecimiento del área y número de fibras blancas (a, b) y del total del miotomo (c,d), a lo largo del desarrollo larvario de *D. labrax atlántica*, sometida a diferentes temperaturas.

O FASE LARVARIA.

En larvas sometidas a 17/19 °C se mantiene una elevada tasa de *hipertrofia* fibrilar a lo largo del desarrollo larvario (Fig. 37a). En el resto de tanques de cultivo tiene lugar un aumento progresivo de la tasa hipertrófica, de tal forma que al finalizar la metamorfosis (escamación), la tasa de crecimiento de este parámetro es similar a todas las temperaturas, aunque ligeramente menor a 15 °C/ambiente.

En el período larvario la *hiperplasia* fibrilar es continua y creciente en todos los tanques de cultivo. La producción diaria de fibras es mayor en las larvas cultivadas a altas temperaturas (Fig. 37b), mientras que en las larvas cultivadas a temperatura ambiente, se observa un incremento más gradual de la tasa hiperplásica.

El *área total del miotomo* (Fig. 37d) aumenta como resultado de la hipertrofia e hiperplasia fibrilares, si bien, la contribución de ambos parámetros a la tasa de crecimiento del miotomo varía en función de la temperatura de cultivo. Al final del desarrollo larvario, la tasa de crecimiento del miotomo es mayor en larvas cultivadas a 19 °C, que presentan una mayor tasa hiperplásica que las larvas cultivadas a temperatura ambiente.

IV-3.3.1.2. *D. labrax* MEDITERRÁNEA

O FASES EMBRIONARIA Y PRELARVARIA.

Durante la fase embrionaria, el *área de las fibras blancas* presenta una elevada tasa de crecimiento (Fig. 38a), observándose un mayor incremento diario a 17 °C de incubación. Posteriormente, en la fase prelarvaria, se observa un descenso de este parámetro en todos los tanques de cultivo, pero fundamentalmente en los ejemplares que fueron incubados a 17 °C.

La *generación diaria de fibras blancas* (Fig. 38b) es elevada en el período embrionario a todas las temperaturas. Por el contrario, en la fase prelarvaria, la tasa hiperplásica disminuye considerablemente en todos los tanques de cultivo, llegando incluso a ser negativa en el tanque mantenido a 17/19 °C.

La tasa de crecimiento del *área total del miotomo* muestra una tendencia similar a la del área de las fibras blancas (Fig. 38c).

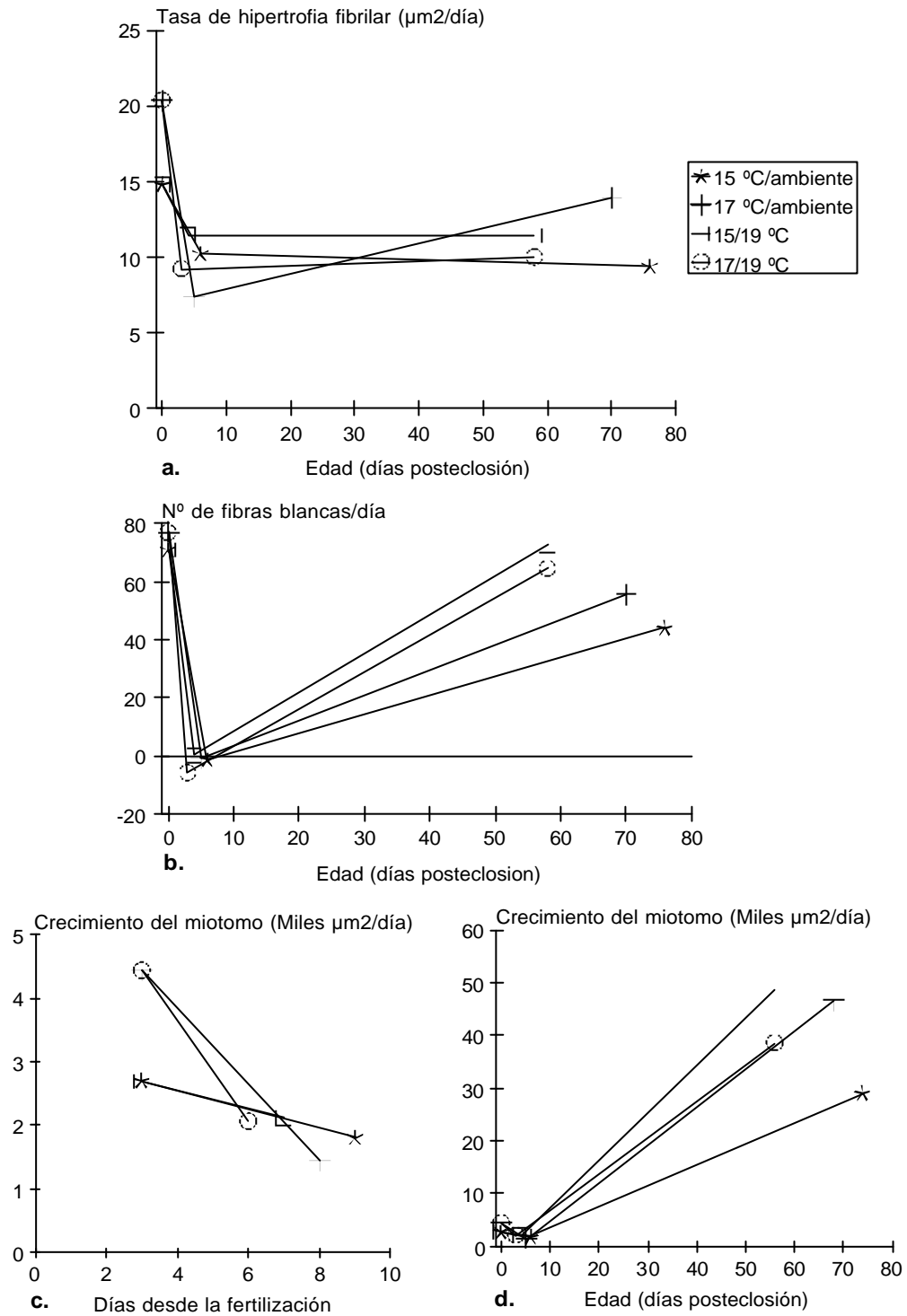


Fig. 38 (a-d). Tasas de crecimiento del área y número de fibras blancas (a,b) y del total del miotomo (c,d) a lo largo del desarrollo larvario de *D. labrax mediterranea* mantenida a diferentes regímenes de temperatura.

O FASE LARVARIA.

Tras la apertura de la boca, la tasa de *hipertrofia fibrilar* (Fig. 38a) se mantiene prácticamente constante en todos los tanques de cultivo, excepto en larvas mantenidas a 17 °C/ambiente, en las que tiene lugar un aumento gradual de este parámetro, alcanzando a la escamación un valor máximo. No obstante, la tasa hipertrófica al final del desarrollo larvario no muestra grandes diferencias entre tanques.

El *número de fibras* del miotomo (Fig. 38b) se incrementa más rápidamente en las larvas cultivadas a mayor temperatura.

La tasa de crecimiento del *área total del miotomo* aumenta a lo largo de la fase larvaria en todos los tanques (Fig. 38d). El mayor incremento final se observa en las larvas mantenidas a 15/19 °C y a 17 °C/ambiente, combinaciones de temperatura en las que tiene lugar la mayor tasa hiperplásica e hipertrófica, respectivamente. Por tanto, la contribución de ambos parámetros al total del miotomo es diferente en función de la temperatura de cultivo.

IV-3.3.1.3. COMPARACIÓN *D. labrax* ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA

O FASES EMBRIONARIA Y PRELARVARIA.

La hipertrofia e hiperplasia fibrilares presentan un mayor incremento en la fase embrionaria que en la fase prelarvaria en ambas poblaciones de *D. labrax*, pero su respuesta frente a la temperatura es distinta entre ellas. Así, en *D. labrax atlántica*, la tasa hiperplásica se muestra más influida por las altas temperaturas durante la fase embrionaria; sin embargo, la tasa de crecimiento del área de las fibras es más sensible a la temperatura en la fase prelarvaria. En *D. labrax mediterránea*, la tasa hipertrófica se muestra más influida por la temperatura en el período embrionario que en la fase prelarvaria, no observándose influencia de la temperatura sobre la tasa hiperplásica.

En ambas poblaciones de *D. labrax* la tasa de crecimiento del total del miotomo muestra la misma tendencia que la del área de sus fibras.

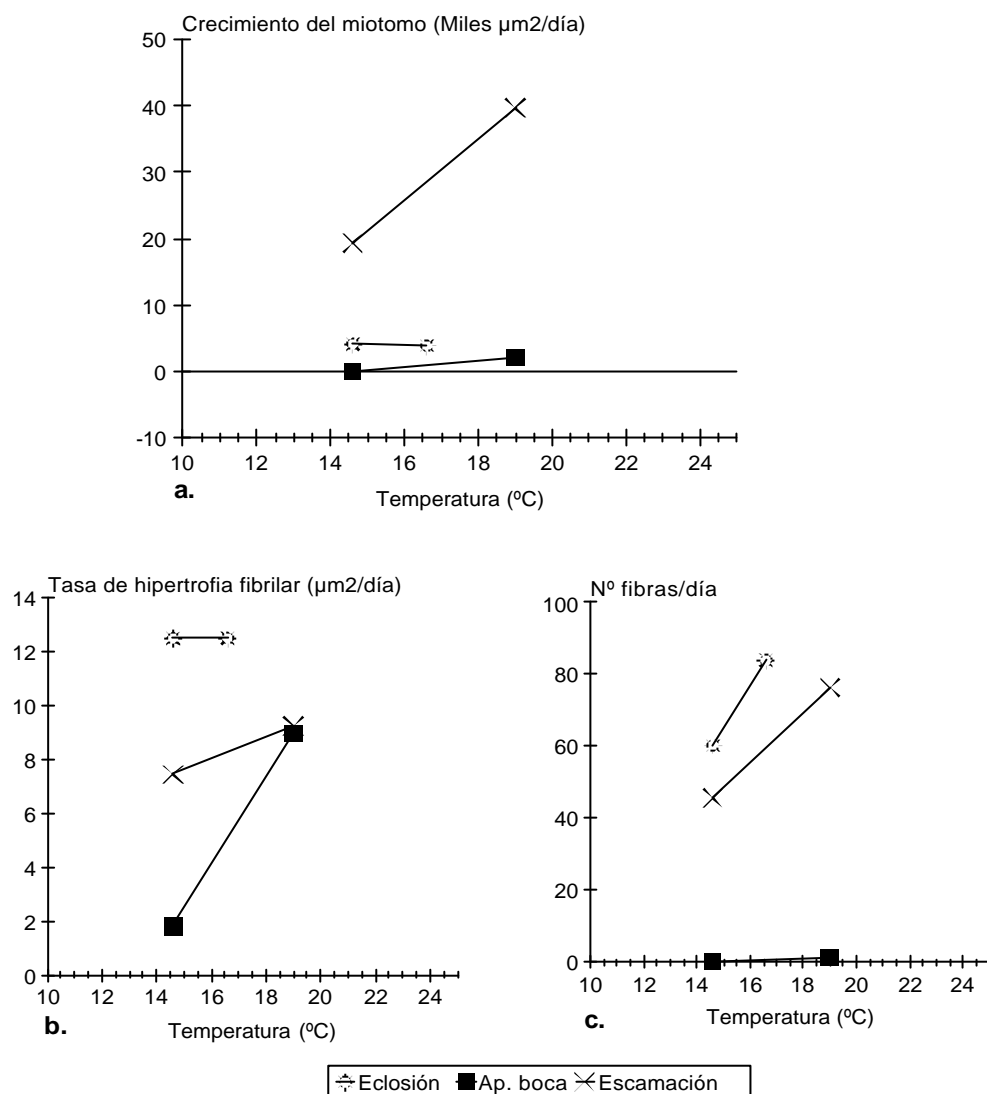
O FASE LARVARIA.

Tanto en *D. labrax* atlántica como en *D. labrax* mediterránea, la temperatura de cultivo fue determinante para completar la metamorfosis, produciéndose antes en los ejemplares cultivados a mayor temperatura (52 días en los cultivados a altas temperaturas, frente a 68-73 días en los cultivados a temperatura ambiente). El rápido crecimiento que experimenta el miotomo en los ejemplares de ambas poblaciones cultivados a alta temperatura, fue paralelo a una mayor generación de fibras (tasa hiperplásica).

En *D. labrax* atlántica, la mayor tasa de crecimiento final del miotomo se alcanza en larvas cultivadas a altas temperaturas, cuya tasa hiperplásica es mayor que en larvas mantenidas a temperatura ambiente. En *D. labrax* mediterránea las mayores tasas finales se alcanzan a 15/19 °C (que presentan la mayor tasa hiperplásica de todos los tanques de cultivo) y a 17 °C/ambiente (con una mayor tasa hipertrófica que en el resto de combinaciones). Por tanto, ambas poblaciones de *D. labrax* no manifiestan el mismo comportamiento frente a la temperatura. En *D. labrax* atlántica, el crecimiento final del miotomo se ve más influido por las altas temperaturas de cultivo, y está correlacionado fundamentalmente con una mayor generación de fibras. *D. labrax* mediterránea manifiesta una interacción $T^{inc} \cdot T^{cult.}$, con una participación más homogénea de ambos parámetros (área y número de fibras) al total del miotomo.

Una vez estudiadas las tasas de crecimiento muscular de *D. labrax* atlántica y mediterránea, a partir de los datos experimentales se han hallado **ecuaciones** que tratan de representar numéricamente la tasa de crecimiento del músculo ante las diferentes temperaturas. Con el fin de simplificar los resultados obtenidos, sólo se exponen las ecuaciones correspondientes a los tanques donde se aplicaron bajas y altas temperaturas de forma continua desde la fertilización hasta la escamación (15 °C/ambiente y 17/19 °C), obviando el resto de combinaciones de temperatura usadas en este estudio.

Las Figs. 39 (a-c) y 40 (a-c) representan las tasas de crecimiento frente a la temperatura de *D. labrax* atlántica y mediterránea, respectivamente. Tal y como se aprecia en estas figuras, la sensibilidad de la musculatura frente a la temperatura, varía a lo largo del desarrollo larvario. Así, en ambas poblaciones de *D. labrax*, la tasa de crecimiento del total del miotomo es baja en las fases iniciales de su desarrollo (eclosión y apertura de la boca) y su sensibilidad a la temperatura muestra un comportamiento más similar al que describe el área de sus fibras que al que presenta el número de fibras. Posteriormente, tras la fase prelarvaria, se aprecia un incremento sustancial en la tasa de crecimiento del miotomo, y una mayor sensibilidad de éste frente a la temperatura que en las fases iniciales, correlacionada fundamentalmente con una mayor tasa hiperplásica en larvas cultivadas a 19 °C. A su vez, la influencia que ejerce la temperatura sobre la generación de fibras es mayor en larvas de *D. labrax* atlántica que en *D. labrax* mediterránea, lo que viene dado por un mayor valor de la pendiente de la recta en cada estadio de desarrollo (ver ecuaciones).

**Área total del miotomo:**

Eclosión. $C = 5783.13 - 119.5T^a$
 Ap. boca. $C = -7273.4 + 490T^a$
 Escamac. $C = -48633.3 + 4650.38T^a$

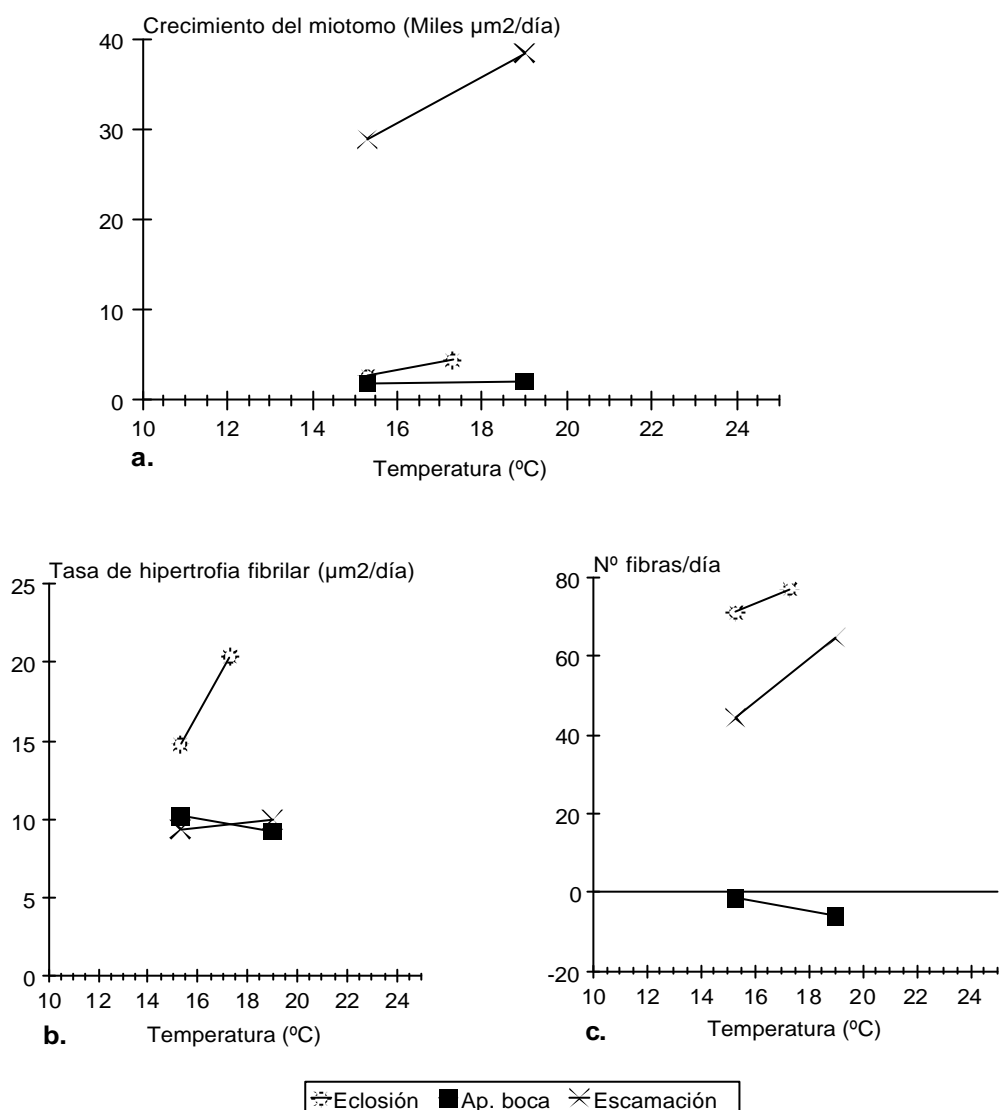
Área de fibras blancas:

Eclosión. $C = 12.5 - (2.16E-16)T^a$
 Ap. boca. $C = -22.09 + 1.6T^a$
 Escamac. $C = 1.48 + 0.4T^a$

N $^{\circ}$ de fibras blancas:

Eclosión. $C = -111.6 + 11.77T^a$
 Ap. boca. $C = -0.07 + 0.04T^a$
 Escamac. $C = -56.57 + 6.99T^a$

Fig. 39 (a-c). Tasas de crecimiento muscular (incremento/día) a la eclosión, a la apertura de la boca y a la escamación, de larvas de *D. labrax atlántica* sometidas a 2 regímenes de temperatura (15 $^{\circ}\text{C}$ /ambiente y 17/19 $^{\circ}\text{C}$)



Área total del miotomo:

Eclosión. $C=-10548.3+865.83T^a$
 Ap. boca. $C=-3284.9+301.6T^a$
 Escamac. $C=-10610.78+2588.76T^a$

Área de fibras blancas:

Eclosión. $C=-28.04+2.8T^a$
 Ap. boca. $C=14.3-0.3T^a$
 Escamac. $C=6.91+0.16T^a$

N° de fibras blancas:

Eclosión. $C=25.53+2.96T^a$
 Ap. boca. $C=17.5-1.2T^a$
 Escamac. $C=-40.33+5.52T^a$

Fig. 40 (a-c). Tasas de crecimiento muscular (incrementos/día) a la eclosión, a la apertura de la boca y a la escamación de larvas de *D. labrax mediterránea* sometidas a 2 regímenes de temperatura (15 $^{\circ}\text{C}/\text{ambiente}$ y 17/19 $^{\circ}\text{C}$).

IV-3.3.2. TASAS DE DESARROLLO DE *D. labrax* ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA.

En la Tabla. 3 (ver material y métodos), se muestra la duración de los diferentes estadios de desarrollo estudiados en *D. labrax* atlántica y mediterránea.

Las altas temperaturas de incubación (17 °C) acortaron el período embrionario en ambas poblaciones de *D. labrax*. Tras la eclosión, en las larvas cultivadas a 19 °C se redujo el tiempo necesario para completar las fases prelarvaria (apertura de la boca) y larvaria (escamación); además, se observa un ligero efecto adicional de la temperatura de incubación sobre la apertura de la boca y la escamación en larvas de *D. labrax* mediterránea, de tal manera que, en larvas cultivadas a una misma temperatura, ambos hechos biológicos se adelantaron en aquellas incubadas previamente a 17 °C, no observándose dicho efecto en larvas de *D. labrax* atlántica.

Por otro lado, se observa una disminución de los grados día necesarios para finalizar la fase prelarvaria (apertura de la boca) en larvas cultivadas a 19 °C, aunque esto es más evidente en *D. labrax* mediterránea que en *D. labrax* atlántica.

La reabsorción del saco vitelino se muestra también influida por la temperatura, y así, tuvo lugar en los siguientes momentos: 3 días posteclosión en larvas de *D. labrax* atlántica y mediterránea sometidas a 15/19 °C y 17/19 °C; 5 días a 17 °C/ambiente en ambos lotes; 6 y 7 días a 15 °C/ambiente en los lotes mediterráneo y atlántico respectivamente.

.....

La Fig. 41 representa la tasa de desarrollo de larvas de *D. labrax* atlántica y mediterránea, mantenidas a temperatura ambiente desde la fertilización hasta el final del desarrollo larvario (15 °C/ambiente), frente a larvas sometidas a altas temperaturas (17/19 °C).

La influencia de la temperatura sobre el desarrollo viene representada por la pendiente de la recta obtenida para cada estadio. En este sentido, observamos que todas las fases de desarrollo están correlacionadas positivamente con la temperatura, tanto en *D. labrax* atlántica como en *D. labrax* mediterránea, y así, en los embriones y larvas sometidos a mayor temperatura se acorta el tiempo necesario para completar cada estadio.

Además, la sensibilidad a la temperatura en ambas poblaciones de *D. labrax* es mayor en las etapas iniciales de desarrollo, siendo máxima a la eclosión.

Las ecuaciones obtenidas para cada estadio de desarrollo fueron las siguientes: En *D. labrax* atlántica:

$$\text{Eclosión. } D = -0.334 + 0.04T^a$$

$$\text{Apertura de la boca. } D = -0.042 + 0.009T^a$$

$$\text{Escamación. } D = -0.003 + 0.0011T^a$$

En *D. labrax* mediterránea:

$$\text{Eclosión. } D = -0.2 + 0.035T^a$$

$$\text{Apertura de la boca. } D = -0.18 + 0.02T^a$$

$$\text{Escamación. } D = -0.0076 + 0.0014T^a$$

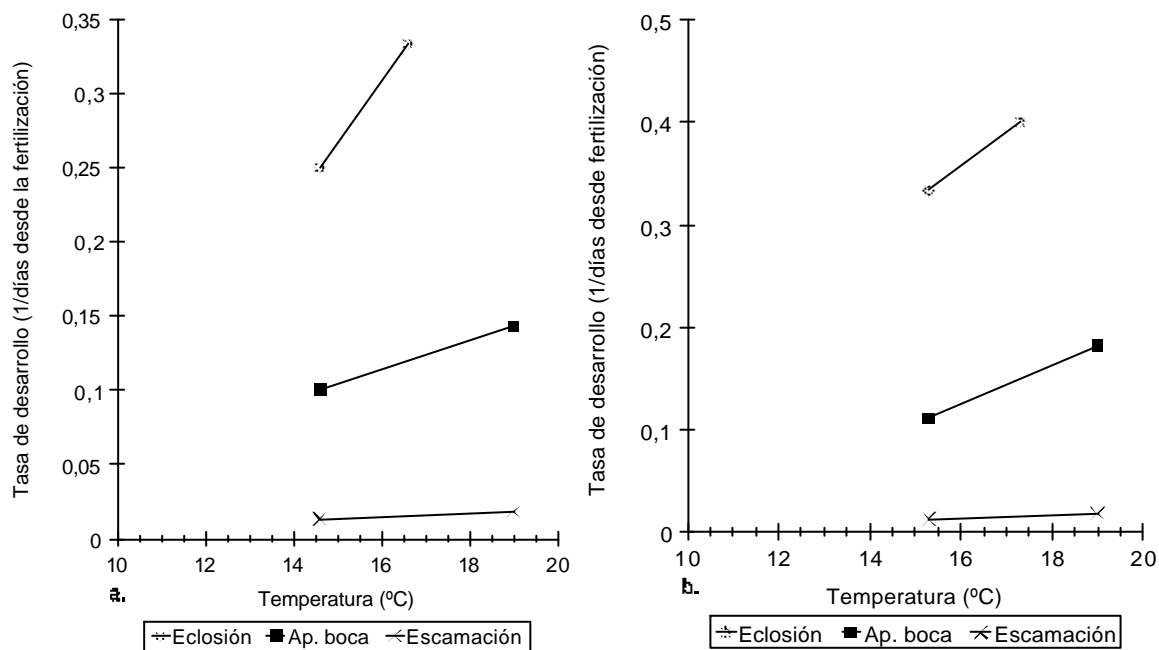


Fig. 41 (a,b). Influencia de la temperatura sobre la aparición de hechos biológicos relacionados con el desarrollo (eclosión, apertura de la boca y escamación) en larvas de *D. labrax* atlántica (a) y mediterránea (b).

IV-3.4. TALLAS Y PESOS CORPORALES, DIÁMETROS DE LOS HUEVOS, LONGITUDES DEL SACO VITELINO Y SUPERVIVENCIAS.

A lo largo del estudio llevado a cabo con *D. labrax* atlántica y mediterránea, se tomaron medidas de los siguientes parámetros corporales: diámetros de los huevos, longitudes de los sacos vitelinos, longitudes y pesos corporales, y supervivencias.

Para cada combinación de temperaturas se emplearon tanques de cultivo duplicados, resultando un total de 16 tanques. Las medidas se tomaron periódicamente por parte del personal del I.E.O (Centro Oceanográfico de Mazarrón) desde la fertilización hasta los 90 días.

La longitud de las larvas de *D. labrax* atlántica y mediterránea a los 3 días posteclosión, fue similar ($\cong 5\text{mm.}$) en todos los tanques de cultivo; y se mantuvo prácticamente constante durante la fase vitelina, sin observarse influencia de la temperatura. Posteriormente, la longitud comenzó a aumentar en todos los tanques de cultivo, pero principalmente en las larvas cultivadas a altas temperaturas, en ambas poblaciones de *D. labrax*. A partir de los 50-55 días, las longitudes y pesos corporales de las larvas cultivadas a 19 °C fueron significativamente mayores que en larvas cultivadas a temperatura ambiente (Figs. 42 y 43).

La temperatura de incubación sólo mostró cierta influencia positiva en el tanque 17 °C/ambiente de *D. labrax* mediterránea, donde se alcanzaron mayores valores de longitud y peso que a 15 °C/ambiente, y este mismo resultado se halló en *D. labrax* atlántica, pero sólo hasta los 25 días.

El mayor crecimiento observado a alta temperatura de cultivo (19 °C) en *D. labrax* de ambas procedencias fue acompañado de una elevada mortalidad desde el inicio de la etapa larvaria, obteniéndose una menor supervivencia final que en los tanques cultivados a temperatura ambiente (Fig. 44). Por su parte, las larvas cultivadas a temperatura ambiente, aunque más tardíamente, alcanzan el final de la metamorfosis con un longitud similar a las cultivados a 19 °C. La longitud a la que se completó este estadio estuvo comprendida dentro del rango $20 \pm 5\text{mm.}$, si bien dentro de este rango la mayor longitud se alcanzó a 17 °C/ambiente de *D. labrax* mediterránea.

La elevada mortalidad registrada en las larvas cultivadas a 19 °C nos lleva a sugerir que la aplicación de esta temperatura desde la eclosión (con aumentos de 1 °C/día a partir

de la temperatura ambiente) sobrepasa el límite del rango considerado óptimo para los primeros estadios larvarios en esta especie.

La Fig. 45a,b representa la longitud del saco vitelino en *D. labrax* atlántica y mediterránea. En ambas poblaciones, la reabsorción del saco vitelino a 19 °C de cultivo tuvo lugar muy pronto ($\cong 3$ días), lo que indica una aceleración del metabolismo que podría ser perjudicial para la supervivencia larvaria.

Por otra parte, la población de *D. labrax* mediterránea presentó un bajo índice de supervivencia. Sin embargo, los ejemplares de esta población alcanzaron un mayor crecimiento en longitud y peso corporales que los ejemplares de *D. labrax* atlántica, lo que pudo estar asociado a una menor densidad de cultivo en *D. labrax* mediterránea, motivada por su alta mortalidad.

La Fig. 45c muestra el valor medio del diámetro de los huevos procedentes de la puesta de ambas poblaciones de *D. labrax* a lo largo de la fase embrionaria. Tal y como se aprecia en la figura, el tamaño es similar entre ellos (1171-1290 μm).

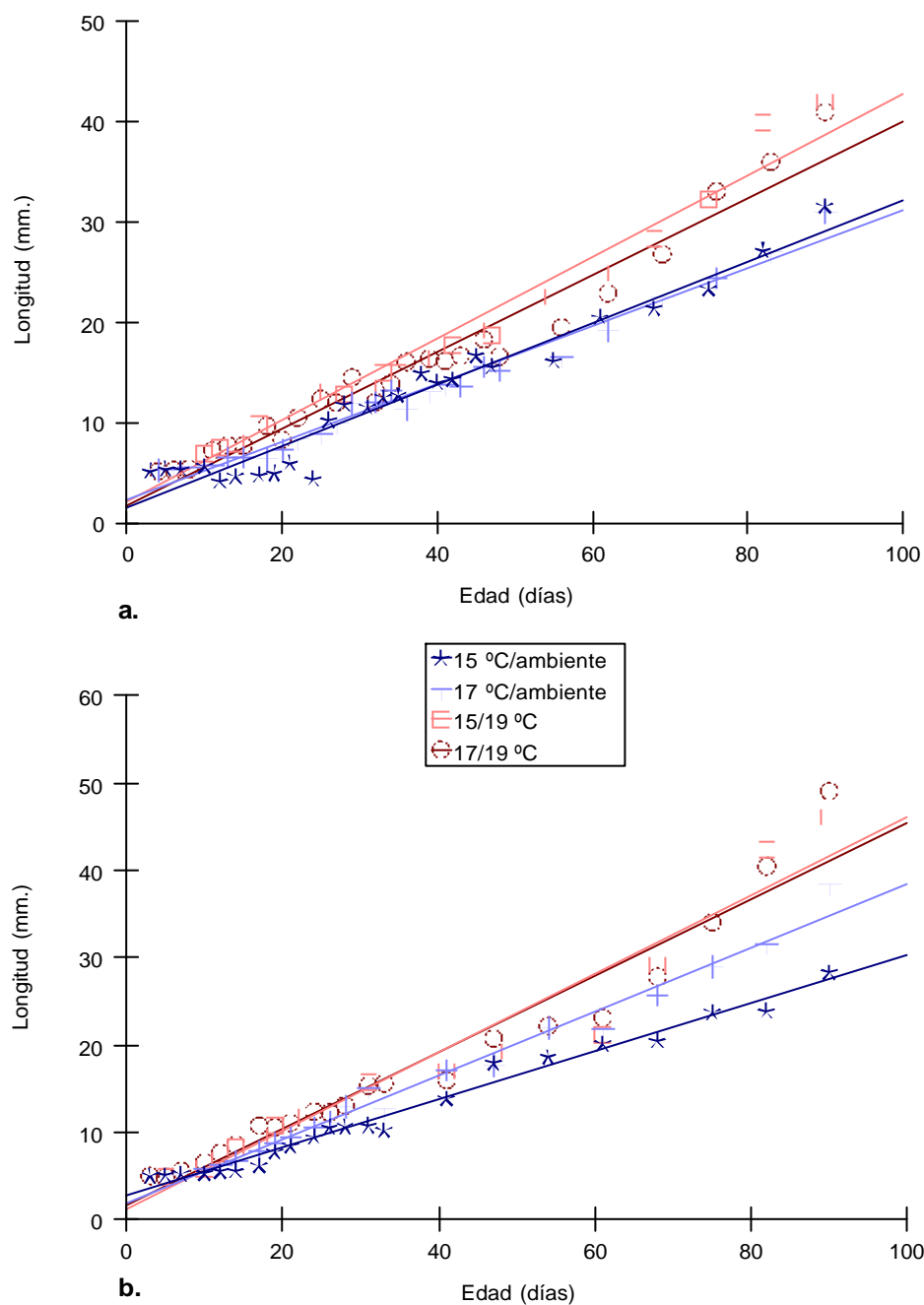


Fig 42 (a,b). Longitudes de las larvas de *D. labrax atlántica* (a) y *D. labrax mediterránea* (b) desde la eclosión hasta los 90 días. a) Tras un ajuste lineal, las ecuaciones obtenidas en *D. labrax atlántica* fueron: $L=1.5+0.31t$ ($r^2=0.97$) a 15 °C/ambiente, donde L es longitud, y t es días posteclosión; $L=2.28+0.29t$ ($r^2=0.98$) a 17 °C/ambiente; $L=2.03+0.41t$ ($r^2=0.99$) a 15/19 °C; $L=1.65+0.38t$ ($r^2=0.98$) a 17/19 °C. b) Tras un ajuste lineal, las ecuaciones obtenidas en *D. labrax mediterránea* fueron: $L=2.77+0.27t$ ($r^2=0.99$), a 15 °C/ambiente; $L=1.88+0.37t$ ($r^2=0.98$) a 17 °C/ambiente; $L=1.17+0.45t$ ($r^2=0.97$) a 15/19 °C; $L=1.58+0.44t$ ($r^2=0.94$) a 17/19 °C.

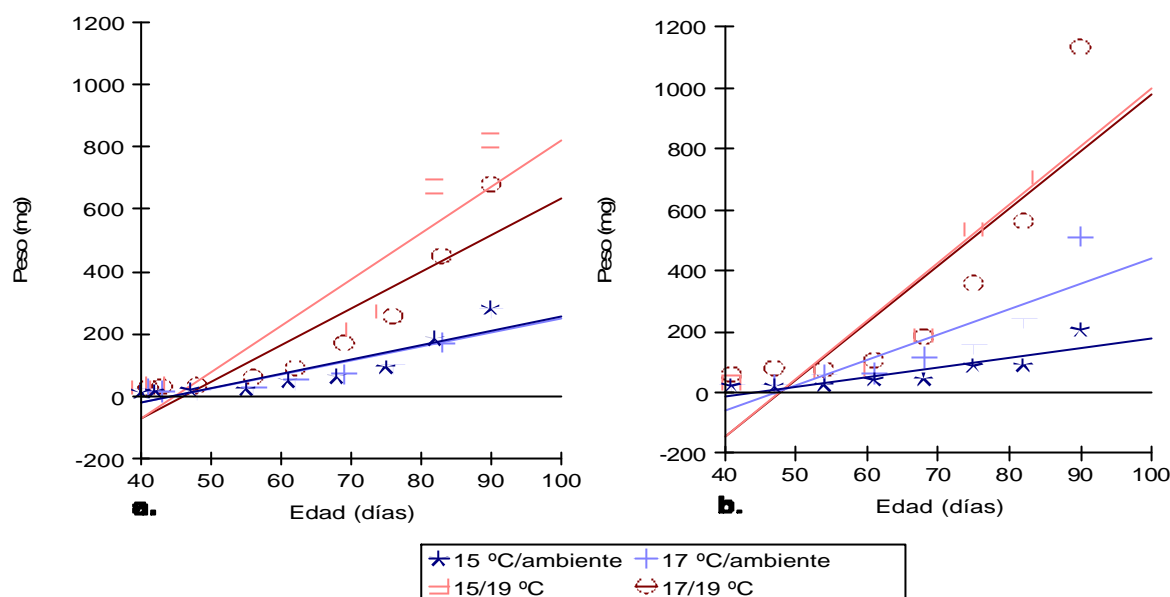


Fig. 43 (a,b). Pesos de las larvas de *D. labrax atlántica* (a) y *D. labrax mediterránea* (b) desde los 40 hasta los 90 días. (a) Tras un ajuste lineal, las ecuaciones obtenidas en *D. labrax atlántica* fueron: $P=-207.2+4.7t$ ($r^2=0.81$) a 15 °C/ambiente, donde P es peso, y t es días posteclosión; $P=-200.9+4.5t$ ($r^2=0.81$) a 17 °C/ambiente; $P=-664.8+14.8t$ ($r^2=0.82$) a 15/19 °C; $P= -541.64+11.7t$ ($r^2=0.83$) a 17/19 °C. (b) Tras un ajuste lineal, las ecuaciones obtenidas en *D. labrax mediterránea* fueron: $P=-137.5+3.2t$ ($r^2=0.75$), a 15 °C/ambiente; $P=-389.2+8.3t$ ($r^2=0.72$) a 17 °C/ambiente; $P=-912.2+19.1t$ ($r^2=0.86$) a 15/19 °C; $P=-894.6+18.7t$ ($r^2=0.74$) a 17/19 °C.

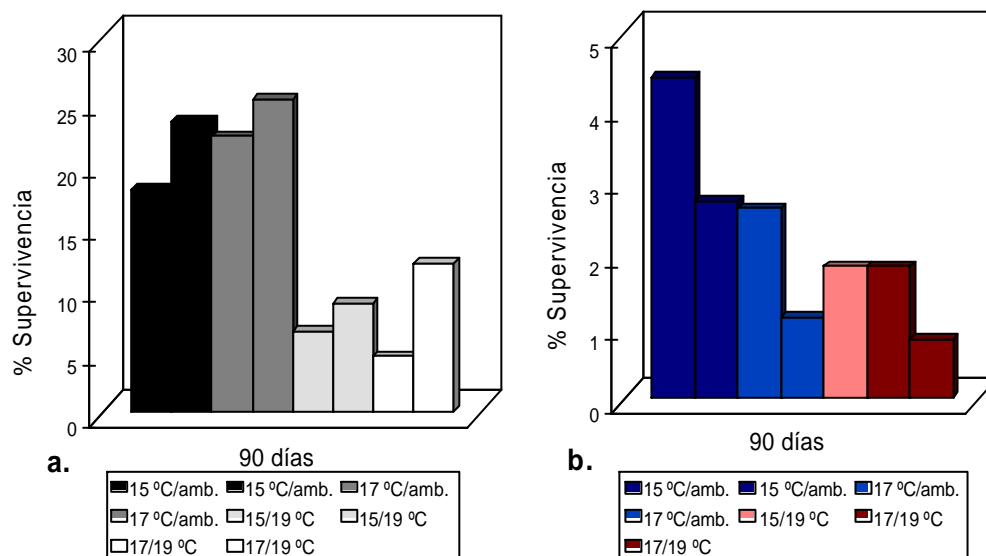


Fig. 44 (a,b). Porcentaje de supervivencia de larvas de *D. labrax atlántica* (a) y *mediterránea* (b) a los 90 días en todos los tanques de cultivo (incluidos los tanques duplicados).

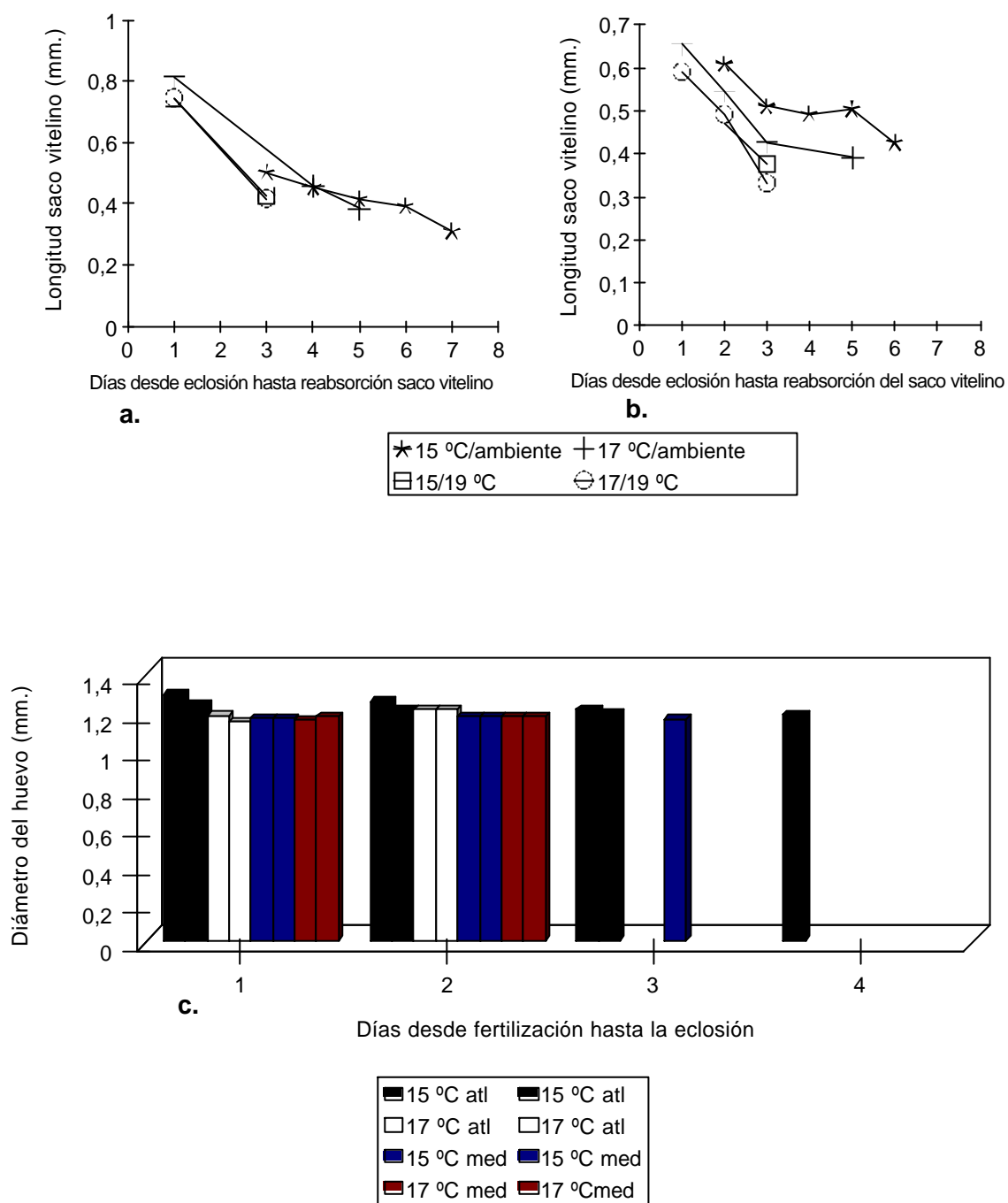


Fig. 45 (a-c). Longitud del saco vitelino de las larvas de *D. labrax atlántica* (a) y *mediterránea* (b), medidos desde la eclosión hasta su reabsorción. (c) Diámetro de los huevos procedentes de las puestas de *D. labrax atlántica* (atl) y *mediterránea* (med) medidos desde la fertilización hasta la eclosión.

IV-4. CRECIMIENTO MUSCULAR EN *D. labrax* ATLÁNTICA: EXPERIMENTO 3° (1998).

En esta prueba empleamos dos lotes obtenidos de una puesta de *D. labrax* atlántica, que fueron mantenidos a 19 °C/ambiente y 19/19 °C, respectivamente (ver Fig. 9 de material y métodos).

La Fig. 46 representa el crecimiento muscular de ambos lotes. La dinámica de crecimiento que muestran las larvas de *D. labrax* desde la eclosión hasta los 40 días, en que finalizó la prueba, fue la siguiente:

Durante la **fase prelarvaria** se aprecia un crecimiento hipertrófico de las fibras blancas y rojas sin influencia significativa de la temperatura. No se observa hiperplasia de las fibras blancas, e incluso se aprecia una disminución del número de fibras rojas respecto a la eclosión.

Desde los **20 días**, comienza a detectarse la influencia de la temperatura de cultivo, de tal forma que todos los parámetros musculares son mayores a 19 °C de cultivo, de forma significativa para el número de fibras blancas y rojas ($p=0.032$ número de fibras blancas). A los **40 días** continúa la misma tendencia que en el estadio anterior, siendo significativa para todos los parámetros musculares, excepto para el número de fibras blancas y rojas.

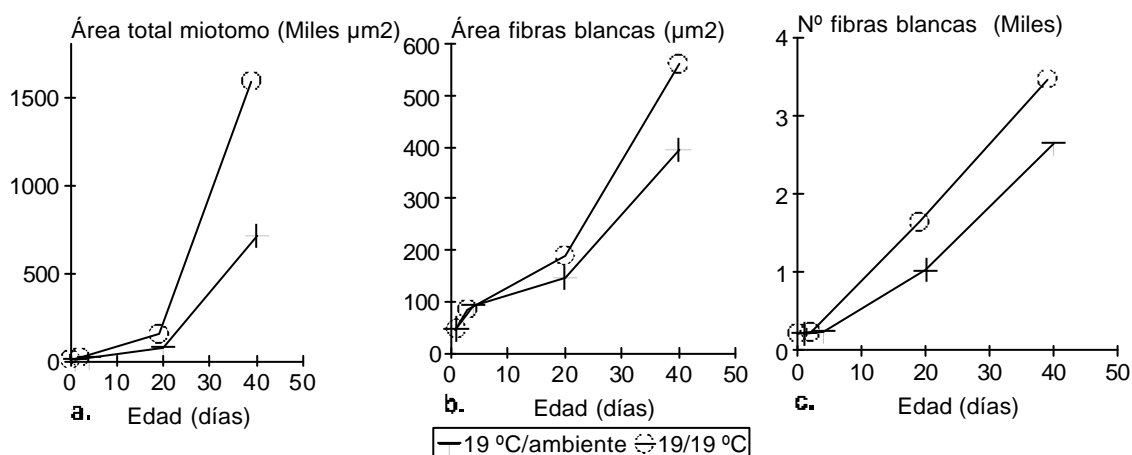


Fig. 46. Efecto de la temperatura de cultivo sobre el área total del miotomo (a), y el área y número de fibras blancas en larvas de *D. labrax* atlántica hasta los 40 días (b,c).

IV-5. COROLARIO.

IV-5.1. COMPARACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *D. labrax* DE 1996, 1997 Y 1998 (Experimentos 1°-3°). EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN.

En este apartado se pretende valorar el efecto de la aplicación de altas temperaturas de incubación sobre el crecimiento posterior de larvas mantenidas a temperatura ambiente tras la eclosión. Para ello, se compara el crecimiento muscular alcanzado a 19 °C/ambiente de 1998 con el que presentaron el resto de poblaciones incubadas a menor temperatura (17 °C/ambiente y 15 °C/ambiente). Se consideran, por tanto, distintas poblaciones de *D. labrax*, lo que implica la introducción de nuevos factores que pueden interrelacionar con la temperatura, y enmascarar la influencia de esta variable, tales como diferencias genéticas, etc., Por ello, la valoración posterior de los resultados que aquí se exponen, se realizará de forma cautelosa y sin una finalidad aplicativa.

IV-5.1.1. COMPARACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *D. labrax* DE 1996 Y 1998 (EXPERIMENTOS 1° Y 3°).

La Fig. 47 describe los resultados hallados al comparar los valores obtenidos a 19 °C/ambiente (1998) con los encontrados a menor temperatura de incubación en larvas correspondientes a la población de 1996 (17 °C/ambiente y 15 °C/ambiente).

A la **eclosión y a la apertura de la boca**, tanto el número como el área de las fibras (blancas y rojas) no se muestran influidos significativamente por la temperatura de incubación (Fig. 47b,c,e,f).

Desde los 20 días hasta el final del estudio (40 días) las larvas que habían sido incubadas a 19 °C, presentan valores significativamente mayores en el número y área de sus fibras musculares blancas que los de las larvas incubadas a menor temperatura. Sin embargo, el crecimiento del músculo rojo se mantuvo independiente de la temperatura de incubación hasta los 40 días. En este momento, el área de las fibras rojas y el área transversal del músculo rojo son significativamente mayores en los ejemplares que habían sido incubados a 19 °C, si bien el número de fibras rojas no presenta variación entre tanques.

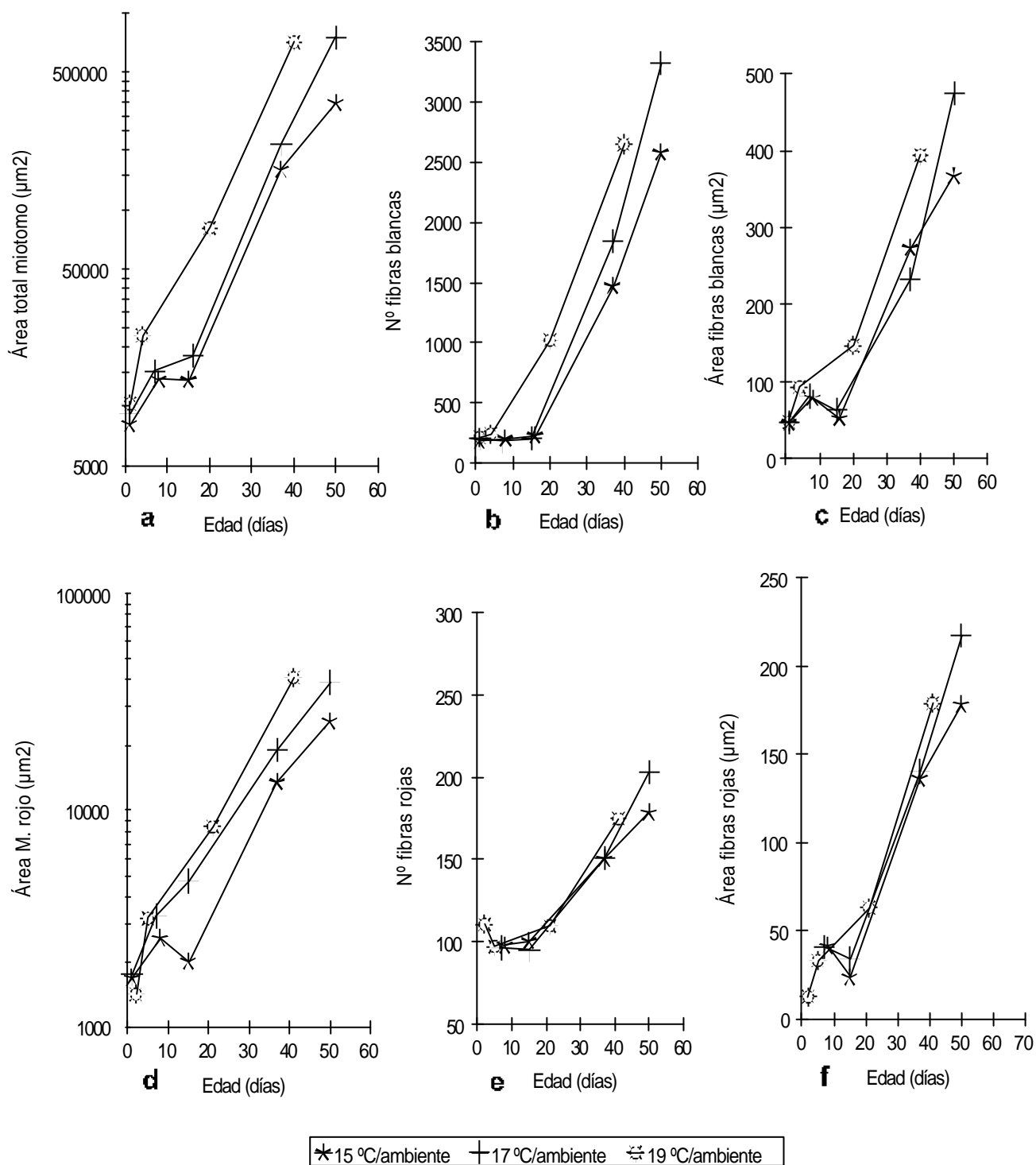


Fig. 47 (a-f). Efecto de la temperatura de incubación (a temperatura ambiental de cultivo) sobre el crecimiento total del miotomo (a-c), y sobre el músculo rojo (d-f) en larvas de *D. labrax atlántica* de 1998 y de *D. labrax mediterránea* de 1996. a) y d) son representaciones semilogarítmicas.

IV-5.1.2. COMPARACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *D. labrax* DE 1997 Y 1998 (EXPERIMENTOS 2° Y 3°).

En este caso exponemos los resultados hallados al comparar el lote de *D. labrax* atlántica mantenido a 19 °C/ambiente (1998) con larvas de *D. labrax* atlántica y mediterránea de 1997 incubadas a menor temperatura (17 °C/ambiente y 15 °C/ambiente).

Al contrario que en el apartado anterior, en este caso no encontramos diferencias significativas entre las larvas de *D. labrax* mediterránea de 1997 y las larvas de *D. labrax* atlántica de 1998 (Fig. 48a,b).

Por su parte, al comparar la población de *D. labrax* atlántica de 1997 con *D. labrax* atlántica de 1998 (Fig. 48c,d), sólo se obtienen algunos datos puntuales, como que, a la **apertura de la boca**, el área de las fibras blancas es significativamente mayor a 19 °C/ambiente que a menor temperatura de incubación. La misma tendencia se observa para el número de fibras blancas a los **20 días** (Fig. 48c,d.).

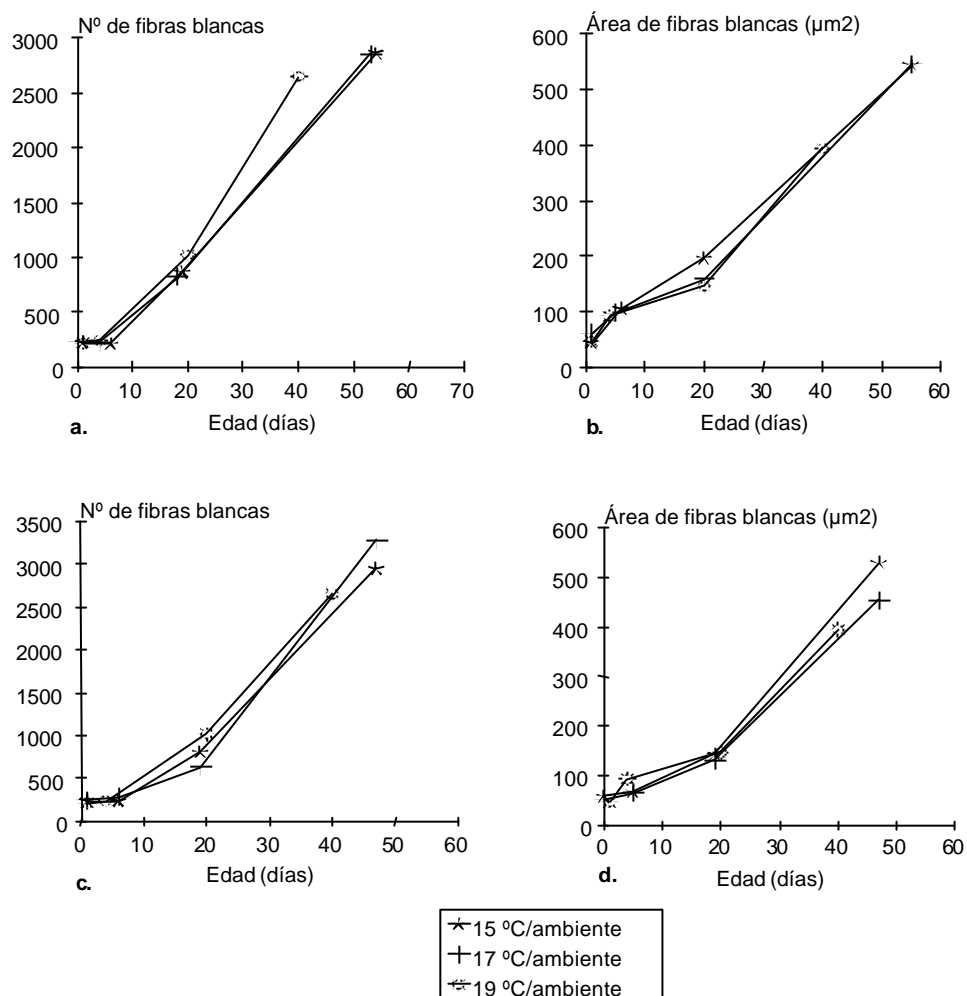
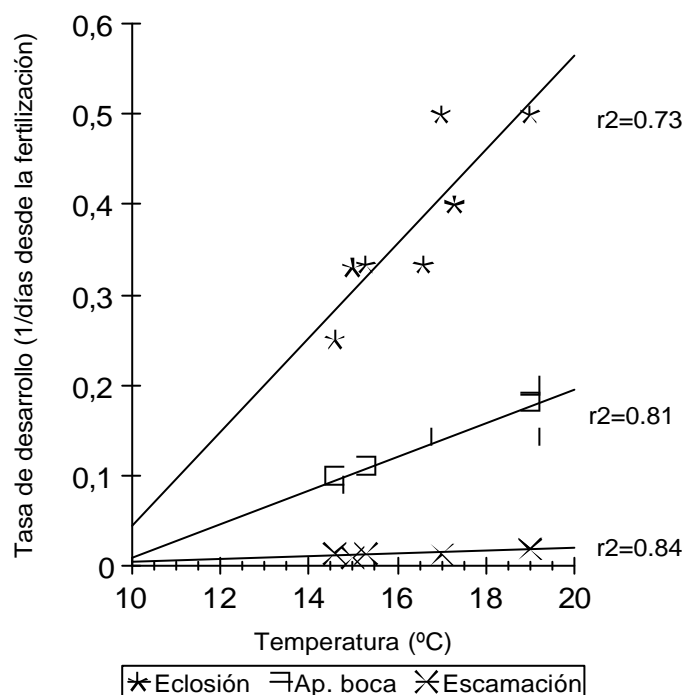


Fig. 48 (a,d). Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento muscular en larvas cultivadas a temperatura ambiente. (a,b) Número y área de las fibras blancas a 19 °C/ambiente (*D. labrax atlántica* 1998) y a 17 °C/ambiente y 15 °C/ambiente (*D. labrax mediterránea* 1997). (c,d) Número y área de las fibras blancas a 19 °C/ambiente (*D. labrax atlántica* 1998) y a 17 °C/ambiente y 15 °C/ambiente (*D. labrax atlántica* 1997).

IV-5.2. TASA DE DESARROLLO DE *D. labrax*. TRATAMIENTO CONJUNTO DE LAS POBLACIONES DE 1996, 1997 Y 1998 (EXPERIMENTOS 1°-3°).

Con el fin de representar la tendencia general que presenta la tasa de desarrollo de *D. labrax* sometida a diferentes temperaturas se han unido los resultados de todos los experimentos: *D. labrax* mediterránea de 1996; *D. labrax* atlántica y mediterránea de 1997, y *D. labrax* atlántica de 1998, y hemos realizado la regresión de los datos obtenidos.

Tal y como muestra la Fig. 49 la sensibilidad del desarrollo corporal frente a la temperatura es mayor en las fases iniciales, según el siguiente orden: período embrionario>período prelarvario>etapa larvaria.



Eclosión. $D = -0.47 + 0.05T^a$. ($r^2 = 0.73$)
 Ap. boca. $D = -0.34 + 0.03T^a$. ($r^2 = 0.81$)
 Escamac. $D = -0.01 + 0.001T^a$. ($r^2 = 0.84$)

Fig. 49. Tasa de desarrollo de *D. labrax* frente a la temperatura, obtenida de la regresión conjunta de los datos hallados en esta especie a diferentes temperaturas.

V.-DISCUSIÓN.

V.-DISCUSIÓN.

V-1. DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE LA MUSCULATURA AXIAL.

En este apartado se contrastan nuestros resultados sobre el crecimiento de la musculatura axial de *Dicentrarchus labrax*, en relación a estudios previos realizados en esta especie.

V-1.1. FASE VITELINA.

A la **eclosión**, las larvas de *D. labrax* de nuestro estudio presentan 2 estratos musculares: músculo superficial rojo y músculo interno blanco. El músculo blanco lo integran varias capas de fibras, las cuales presentan evidentes signos de inmadurez: miofibrillogénesis incompleta, posición central del núcleo, etc. Las fibras superficiales (rojas) presentan un alto contenido mitocondrial y están dispuestas en monocapa, desde el septo horizontal hasta los extremos epi e hipoaxial. Estas características coinciden con las descritas en esta especie por otros autores (Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; López-Albors *et al.*, 1998). La inmadurez fibrilar observada a la eclosión, está relacionada con el corto período de incubación en esta especie. Al final de la **fase**

prelarvaria, con la apertura de la boca y la reabsorción del saco vitelino, aún se observan núcleos en posición central en las fibras internas de *D. labrax*, pero se aprecia un considerable aumento del contenido miofibrilar de las fibras blancas. Todos estos hechos se han observado también en otras especies, como en *S. aurata* (López-Albors, 1994; Patruno *et al.*, 1998).

Durante el **período embrionario**, la **tasa de crecimiento** muscular de *D. labrax* es **alta en todos los parámetros musculares** medidos. Durante esta fase se describe un incremento multiplicativo del tamaño corporal en un corto período de tiempo (Kamler, 1992), hecho que se debe a una alta eficiencia de transformación de la energía que contiene el vitelo del huevo en producción de tejido. Durante la **fase prelarvaria**, las larvas no reciben alimentación externa, sino que dependen de las reservas energéticas del saco vitelino, que, a su vez, se reparten entre producción de tejido (desarrollo y crecimiento) y respiración (metabolismo). En nuestro estudio, observamos una **disminución en la tasa de crecimiento de *D. labrax* en esta fase**, lo que indica, que gran parte de la energía disponible se dirige a satisfacer las necesidades de desarrollo, tanto del músculo como de otros tejidos. En general, numerosas especies de teleósteos presentan una disminución de la tasa de crecimiento cuando predominan los procesos de diferenciación de tejidos (Kamler, 1992).

El escaso crecimiento neto alcanzado por el total del miotomo de *D. labrax* en la fase prelarvaria, tuvo lugar únicamente por hipertrofia de las fibras (blancas y rojas), mientras que el **número de fibras permaneció prácticamente constante**. En otras especies, como *P. major* (Matsuoka, 1984), *C. harengus* (Johnston, 1993; Johnston *et al.*, 1995, 1998) y *S. maximus* (Gibson y Johnston, 1995), el crecimiento durante esta fase fue también debido sólo a la hipertrofia fibrilar. Una posible explicación a este hecho, común a todos los lotes incluidos en este estudio, sería que la síntesis proteica (hipertrofia fibrilar) es un método menos costoso, en términos de gasto energético, que la génesis fibrilar, en un período en el que no se recibe alimentación externa. Por el contrario, la hiperplasia fibrilar, asociada generalmente a las fases de rápido crecimiento, ocurre principalmente cuando los niveles nutricionales no están limitados y el pez puede adquirir

toda la energía necesaria para la generación de nuevas fibras (Usher *et al.*, 1994). En *D. labrax* se evidencia claramente este hecho, y así, tal y como se ha indicado, no se producen fibras durante la fase prelarvaria. Por otra parte, el músculo aún no interviene en la natación continua durante esta etapa, observándose únicamente actividades motrices estereotipadas, no orientadas (Barnabé, 1991), tal y como ha sido observado también en otras especies, como en *S. aurata* por Patruno *et al.* (1998). Estos últimos autores señalan que la adquisición de la funcionalidad natatoria conlleva un aumento de la participación hiperplásica en el crecimiento del miotomo.

En larvas recién eclosionadas, las agallas son estructuras rudimentarias, y la monocapa de fibras rojas sirve de órgano temporal de intercambio de gas, lo que va acompañado de un aumento del porcentaje de dicho músculo respecto al total del miotomo durante esta etapa, tal y como se ha visto en ciprínidos (El-Fiky *et al.*, 1987) y en *S. aurata* (Ayala *et al.*, 1999). En este trabajo hemos hallado resultados similares para *D. labrax*, y así, el porcentaje de músculo rojo hallado durante la fase vitelina resultó ser mayor que en estadíos posteriores.

V-1.2. DESDE EL COMIENZO DE LA ALIMENTACIÓN VIVA HASTA EL DESTETE.

Las características morfológicas que presentan las fibras durante esta etapa, son similares a las descritas en otros trabajos realizados en *D. labrax* (Scapolo *et al.*, 1988; Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998).

Desde los 15-20 días, las fibras blancas aparecen perfectamente diferenciadas (en términos de morfología externa apreciable al microscopio óptico), con un alto contenido de miofibrillas ocupando casi la totalidad de la fibra. Las fibras superficiales presentan mayor madurez que en estadíos anteriores, y contienen abundantes mitocondrias, agrupadas alrededor de las miofibrillas. En la zona del septo horizontal, bajo las fibras superficiales, se aprecia un grupo de fibras con mayor desarrollo y organización miofibrilar que las fibras superficiales. Dichas fibras se corresponden con las fibras rojas adultas identificadas por otros autores en esta especie, mediante técnicas inmunohistoquímicas y de mATPasa, a partir de los 25 días (Scapolo *et al.*, 1988; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995; López-Albors *et al.*, 1998).

La dinámica de crecimiento muscular de *D. labrax* ha sido estudiada previamente por diversos autores (Veggetti *et al.*, 1990; Ramírez-Zarzosa *et al.*, 1995, 1998; Nathanailides *et al.*, 1996; López-Albors *et al.*, 1998), que describen una gran participación hiperplásica en el crecimiento del miotomo a partir del inicio de la alimentación exógena. Similares resultados hemos encontrado en este trabajo. Así, en esta etapa, la dinámica de crecimiento refleja la participación de la hipertrofia y la hiperplasia fibrilares, con un claro predominio de la hiperplasia; apareciendo zonas germinales de fibras de nueva generación en los extremos epi e hipoaxiales del miotomo, así como en la estrecha zona situada en el límite entre los músculos blanco y rojo, que se extiende desde el septo horizontal hasta las zonas apicales. De igual forma, comienzan a aparecer algunas fibras pequeñas entremezcladas en la zona intermedia del miotomo.

La correlación positiva entre el rápido crecimiento en este período y el elevado número de fibras de nueva generación observado en todos los lotes, es característico de las especies que alcanzan un gran tamaño de adulto, cuyo rápido crecimiento ha sido asociado a la hiperplasia fibrilar (Weatherley y Gill, 1987; Higgins y Thorpe, 1990; Patruno *et al.*, 1998). A su vez, el crecimiento característico de esta etapa coincide con un cambio en el comportamiento alimentario y natatorio tras la reabsorción del saco vitelino de las larvas, que manifiestan una gran actividad relacionada con la búsqueda de alimento, tal y como ha sido descrito en *D. labrax* (Barnabé, 1991) y recientemente en *S. aurata* (Patruno *et al.*, 1998).

V-1.3. FINAL DEL DESARROLLO LARVARIO Y FASE POSTLARVARIA.

En estos estadíos, observamos una gran diversidad de tamaños fibrilares extendida por todo el grosor del miotomo, lo que corresponde con la aparición del mosaico de tamaños fibrilares característico de las especies que alcanzan un gran tamaño durante la fase adulta (Weatherley y Gill, 1981; Weatherley *et al.*, 1988; Patruno *et al.*, 1998). En estas fases, el músculo rojo manifiesta también cierta apariencia de mosaico, por la aparición de fibras pequeñas de nueva generación. En los extremos apicales del miotomo comienza a disminuir el número de fibras pequeñas, merced a un aumento en su área fibrilar; y bajo el músculo rojo continúa observándose una zona proliferativa de fibras. Similares características han sido también descritas en esta especie por Ramírez-Zarzosa

et al. (1998) y López-Albors *et al.* (1998), y en *S. aurata* por Mascarello *et al.* (1995) y López-Albors *et al.* (1998).

En definitiva, en este estudio se ponen de manifiesto diferentes etapas de crecimiento muscular, descritas también por otros autores en los teleósteos (Stoiber y Sängler, 1996): en un primer momento (fase embrionaria), el miotomo lo constituyen fibras musculares derivadas directamente de las células indiferenciadas del somito; posteriormente, se describe un crecimiento aposicional en los extremos dorsoventrales del miotomo; y, finalmente, en las especies que alcanzan un gran tamaño, tiene lugar un tercer mecanismo de crecimiento hiperplásico, que da lugar a una apariencia típica de mosaico. De igual forma, estas etapas han sido descritas por Veggetti *et al.* (1990) y López-Albors (1994) en *D. labrax*.

V-2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO LARVARIO.

El efecto de la temperatura sobre el desarrollo muscular y la organogénesis ha sido estudiado recientemente en embriones y larvas de varios teleósteos (Stickland *et al.*, 1988; Vieira y Johnston, 1992; Brooks y Johnston, 1993; Johnston, 1993; Usher *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1995, 1997; Nathanailides *et al.*, 1995a). En dichas investigaciones se pone de manifiesto una aceleración de la miogénesis y, en general, del desarrollo de los órganos y tejidos corporales de embriones y larvas, por efecto de la temperatura, ocasionando una aceleración de hechos biológicos tales como la eclosión y la reabsorción del saco vitelino.

Tal y como ha sido observado en otras especies, en nuestro estudio, **la tasa de desarrollo de *D. labrax* ha mostrado una clara correlación positiva con la temperatura.** Así, nuestros resultados muestran una disminución del período embrionario en los huevos incubados a mayor temperatura, coincidiendo con estudios previos en esta especie (Jennings y Pawson, 1991, citados por Picket y Pawson, 1994). Tras la eclosión, el resto de hechos biológicos relacionados con el desarrollo, tales como la apertura de la boca, la reabsorción del saco vitelino y la escamación se completaron antes en larvas sometidas a mayor temperatura de cultivo.

La aplicación de altas temperaturas durante el período de incubación ejerció sobre el desarrollo larvario posterior a la eclosión, un ligero efecto adicional al provocado por la temperatura de cultivo, siendo este hecho más evidente en *D. labrax* mediterránea (poblaciones correspondientes a los años 1996 y 1997) que en *D. labrax* atlántica (población de 1997). Así, aunque en todos los lotes de *D. labrax* las altas **temperaturas de cultivo** aceleraron la culminación de los diferentes estadios de desarrollo, en *D. labrax* mediterránea las altas **temperaturas de incubación** también intervinieron adelantado ligeramente el desarrollo tras la eclosión. Se pone así de manifiesto, que el efecto de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *D. labrax* mediterránea persiste a largo plazo, tal y como ocurre en *C. harengus* (Johnston *et al.*, 1997). En esta última especie, se incubaron huevos a diferentes temperaturas, y se observó que, a los 20 mm. de longitud, la aleta anal estaba más desarrollada en larvas incubadas a mayor temperatura.

Mediante estudios cuantitativos, Winberg (1987, citado por Kamler, 1992) encontró que el modelo de ajuste lineal describe adecuadamente la relación entre la tasa de desarrollo de muchos poiquiloterms acuáticos y la temperatura ambiental, dentro del rango de temperaturas tolerable para cada especie. En *D. labrax* hemos hallado también, tras la regresión conjunta de todos los datos obtenidos, que existe una relación lineal entre la tasa de desarrollo y la temperatura, dada por la ecuación $D=a+bT^a$, donde D es tasa de desarrollo (1/días desde la fertilización hasta la culminación de un estadio de desarrollo), y T^a es la temperatura. Mediante las ecuaciones experimentales obtenidas, hemos puesto de manifiesto que **la sensibilidad a la temperatura** (representada numéricamente por la pendiente de la recta) **es especialmente alta durante las fases iniciales del desarrollo de *D. labrax***, decreciendo a lo largo del desarrollo larvario.

En muchas especies de teleósteos, se ha observado que los grados día ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$) necesarios para alcanzar un estadio de desarrollo dado, se ven poco influidos por cambios en la temperatura ambiental. No obstante, se han encontrado ejemplos (Tatarko, 1965; Kokurewicz, 1970, 1971; Vovk, 1974, citados por Kamler, 1992) que muestran una disminución de los grados día al aumentar la temperatura. En general, en especies de agua fría, dentro del rango óptimo para su desarrollo, los grados día son poco dependientes de la temperatura (Kamler, 1992). En *D. labrax* mediterránea (poblaciones de 1996 y 1997), hemos observado una disminución de los grados día necesarios para la apertura de la boca ante incrementos de la temperatura, mientras que en *D. labrax* atlántica (1997), los grados

día fueron menos dependientes de la temperatura, manifestando con ello, un comportamiento similar al de las especies de agua fría.

La duración del período mixto de alimentación (alimentación vitelina y comienzo de la alimentación externa, con la apertura de la boca) es característico de cada especie y depende de la temperatura: es más largo en especies que ponen huevos de mayor tamaño, y en larvas que se desarrollan a menor temperatura. En los ejemplares de *D. labrax* de nuestro estudio, no tuvo lugar un período mixto de alimentación, ya que la reabsorción del saco vitelino coincidió con la apertura de la boca. Sólo las larvas de *D. labrax* atlántica mantenidas a 15 °C/ambiente, abrieron la boca un día antes de la reabsorción del saco vitelino. La existencia de un período mixto se considera ventajoso para la supervivencia ante escasez de recursos (Fukuhara, 1990); por lo que, las larvas de *D. labrax* atlántica mantenidas a 15 °C/ambiente, manifestaron una respuesta más favorable para su supervivencia que el resto de larvas, cuya reabsorción tuvo lugar muy rápidamente.

En resumen, el principal efecto de la temperatura es un **efecto acelerador sobre el desarrollo**, que es especialmente intenso durante las fases iniciales (período embrionario). Este hecho es constante en todos los lotes de *D. labrax* estudiados, y prevalece sobre las ligeras variaciones intraespecíficas encontradas. Dichas variaciones pueden ser consecuencia de las diferencias genéticas entre los lotes, tal y como ha sido encontrado en otras especies. Así, Johnston (1993) atribuyó las diferencias encontradas en el crecimiento de diferentes lotes de *C. harengus*, a interacciones genotipo-ambiente.

V-3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO MUSCULAR.

V-3.1. FASE VITELINA.

En diferentes especies de teleósteos se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre el crecimiento del miotomo, a la eclosión y durante los primeros estadios larvarios (Stickland *et al.*, 1988; Vieira y Johnston, 1992; Johnston, 1993; Usher *et al.*, 1994;

Johnston y Mclay, 1997). **La contribución relativa de la hipertrofia e hiperplasia** fibrilares al crecimiento muscular se ve significativamente influenciada por la temperatura en las diferentes especies estudiadas, y muestra una gran variabilidad intra e interespecífica. De igual forma, en nuestro estudio se aprecian diferencias significativas en los distintos lotes de *D. labrax*, en relación a la respuesta que presentan los mecanismos de crecimiento (hipertrofia e hiperplasia) frente a la temperatura. A la **eclosión**, en *D. labrax mediterránea* (población de **1996**) observamos un aumento de la tasa de generación de nuevas fibras y de la tasa de crecimiento hipertrófico en las larvas incubadas a alta temperatura (17 °C), si bien, el valor neto alcanzado por ambos parámetros musculares a la eclosión no muestra diferencias significativas entre las distintas temperaturas.

En *D. labrax mediterránea*, correspondiente a la población de **1997**, sólo la tasa hipertrófica es mayor en las larvas incubadas a mayor temperatura, no viéndose influida la tasa de generación fibrilar. El resultado neto a la eclosión es un aumento significativo del área transversal de los músculos blanco y rojo, en las larvas incubadas a mayor temperatura, merced a un aumento del área de sus fibras, sin diferencias en su número. Semejantes resultados han sido hallados por Gibson y Johnston (1995) en larvas recién eclosionadas de *S. maximus*, incubadas a 12 y 16 °C. En las larvas de *D. labrax atlántica* (**1997**), por su parte, el área del músculo blanco y la hipertrofia de sus fibras están aumentadas a 15 °C, mientras que la hiperplasia, por el contrario, se ve estimulada a altas temperaturas de incubación. En *C. harengus* ha sido también observado un aumento de la hiperplasia, junto con un descenso de la hipertrofia a elevadas temperaturas de incubación (Vieira y Johnston, 1992; Johnston *et al.*, 1995). Por su parte, Johnston y Mclay (1997) encontraron en *S. salar*, que el crecimiento del miotomo a la eclosión, así como la hipertrofia e hiperplasia fibrilares estaban aumentados en ejemplares incubados a baja temperatura.

Al finalizar la fase prelarvaria, con la **apertura de la boca**, el comportamiento de los parámetros musculares frente a la temperatura (de incubación y cultivo) mostró, de nuevo, variaciones entre las diferentes poblaciones de *D. labrax*. En *D. labrax mediterránea* (**1996 y 1997**), el área transversal del músculo blanco y el área de sus fibras no mostraron influencia de la temperatura, coincidiendo estos resultados con los hallados en *C. harengus* durante los primeros días de vida larvaria (Johnston *et al.*, 1998). Sin embargo, en *D. labrax atlántica* (**1997**) estos mismos parámetros (músculo blanco y

área de sus fibras), aumentaron significativamente en las larvas cultivadas a mayor temperatura.

Aparte de estas diferencias intraespecíficas, en la fase prelarvaria destaca el hecho de que la temperatura apenas modifica el número de fibras en todos los lotes estudiados, incluido el lote de 1998. En larvas de *C. harengus*, Johnston *et al.* (1998) tampoco observaron influencia de la temperatura en el número de fibras presente en esta fase, y similares resultados fueron hallados en *S. maximus* por Gibson y Johnston (1995).

El efecto de la temperatura sobre la hipertrofia e hiperplasia del **músculo rojo** ha sido menos estudiado, pero en general, en los estudios realizados hasta el momento, la respuesta descrita para este músculo es similar a la que presenta el músculo blanco (Usher *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1995; Johnston y Mclay, 1997). De igual forma, en este trabajo, el músculo rojo de *D. labrax* ha mostrado un comportamiento semejante al del músculo blanco, tanto a la eclosión como a la apertura de la boca, aunque con algunas variaciones en este último estadio. A la eclosión, tal y como indicamos anteriormente, las altas temperaturas de incubación aumentaron significativamente el área transversal de este músculo y el área de sus fibras en *D. labrax* mediterránea de 1997. Dado el elevado metabolismo aeróbico que caracteriza este músculo (El-Fiky *et al.*, 1987), estos resultados podrían indicar un aumento de la tasa metabólica general a altas temperaturas. Esto ha sido observado en larvas recién eclosionadas de diversas especies, en las que las altas temperaturas de incubación aumentaron el contenido mitocondrial de las fibras superficiales (Brooks y Johnston, 1993). A la apertura de la boca, tal y como ocurre en el músculo blanco, no se observa hiperplasia, e incluso, se aprecia una disminución en el número de fibras rojas en larvas de *D. labrax* atlántica y mediterránea (1997) incubadas previamente a mayor temperatura. Estos resultados son semejantes a los hallados en embriones de *S. salar* (Usher *et al.*, 1994), en los que se apreció un menor número de fibras rojas, pero de mayor diámetro, a altas temperaturas de incubación.

Por otra parte, en los lotes de *D. labrax* que hemos estudiado, la temperatura no afectó a la proporción del músculo rojo respecto al total del miotomo, coincidiendo con los resultados hallados previamente por Usher *et al.* (1994) en *S. salar*.

Los resultados obtenidos en los músculos blanco y rojo muestran que **la hipertrofia y la hiperplasia musculares de *D. labrax* durante la fase embrionaria, son bastante sensibles al efecto de la temperatura.** Sin embargo, ambos parámetros no se

ven influenciados por la temperatura de igual forma, hecho que ha sido constatado también en otras especies, como en *S. salar* (Stickland *et al.*, 1988) y *C. harengus* (Vieira y Johnston, 1992). En la fase prelarvaria, sin embargo, disminuye la sensibilidad frente a la temperatura de la musculatura de *D. labrax*, siendo especialmente significativo que la tasa de generación de fibras se reduce mucho, con independencia de la temperatura.

Las diferentes respuestas que presentan la hipertrofia e hiperplasia fibrilares frente a la temperatura durante los períodos iniciales de desarrollo, podrían ser explicadas porque la síntesis proteica y la división celular tienen diferente grado de dependencia de la temperatura (Brooks y Johnston, 1993). En este sentido, Johnston *et al.* (1996) consideran que la temperatura puede influir sobre los mecanismos reguladores de la miogénesis, y en base a esto, formulan dos hipótesis para explicar el efecto de la temperatura de incubación sobre los parámetros musculares en las larvas de *C. harengus*: por un lado, sugirieron que la temperatura modifica la **tasa de división** de la población de células precursoras musculares durante el período embrionario, y en consecuencia, el número de fibras del miotomo presentes a la eclosión (ver Fig. 1). Por otro lado, el **grado de diferenciación** de los mioblastos a la eclosión puede variar en función de la temperatura de incubación (Johnston, 1993), lo que podría influir en las características del crecimiento del miotomo en el futuro. La diferenciación muscular depende de complejos mecanismos de control e inducción, procedentes de los tejidos próximos al somito, particularmente la notocorda, que junto con el ectodermo inducen la transcripción de los factores reguladores miogénicos (MRFs) (Molkentin y Olson, 1996). La temperatura podría actuar sobre la producción de las señales enviadas por los tejidos inductores para la diferenciación muscular (Johnston *et al.*, 1996). La acción de estos mecanismos podría determinar que algunos de los componentes que participan en el crecimiento futuro del miotomo queden ya fijados desde las fases iniciales de la vida del pez (Johnston *et al.*, 1998). Para profundizar en esta hipótesis, estos autores realizaron nuevos experimentos, cuyos resultados (Johnston *et al.*, 1998) serán discutidos con los nuestros al tratar el efecto de la temperatura al final de la metamorfosis (apartado V-3.3.).

Aparte de la posible influencia de la temperatura sobre los mecanismos reguladores de la miogénesis, dicha variable actúa sobre aspectos muy importantes del desarrollo. Así,

en embriones y prelarvas, la temperatura puede acelerar tanto la tasa de transformación de energía en producción de tejido, como el metabolismo (Blaxter, 1988, citado por Kamler, 1992). De este modo, los peces tienen que adoptar una estrategia que posibilite un uso óptimo de los recursos energéticos del saco vitelino. En *Clarias gariepinus*, Kamler *et al.* (1994) encontraron la **existencia de un óptimo de temperatura en el cual se logra la mayor eficacia de conversión energética del vitelo en tejido**. En *S. salar* incubado a diferentes temperaturas, Usher *et al.* (1994) observaron que las altas temperaturas aumentaban el área de las fibras blancas a la eclosión, pero disminuían tanto la hiperplasia como el número de núcleos por fibra muscular. Este fenómeno fue atribuido a que la distribución de la fuente energética dio prioridad a la formación de proteína muscular, que determina el tamaño corporal, más que el número de núcleos. Estos resultados son similares a los hallados para la misma especie por Stickland *et al.* (1988). De igual forma, en nuestro estudio encontramos que, aunque el crecimiento neto del miotomo de *D. labrax* es cuantitativamente escaso durante la fase vitelina, el incremento diario o tasa de crecimiento del miotomo generalmente es mayor a altas temperaturas, asociado a una mayor hipertrofia fibrilar. El hecho de que la hipertrofia muscular esté incrementada en las larvas que ven acelerado su desarrollo por efecto de la temperatura, contrasta con el hecho general encontrado en peces juveniles, cuyo rápido crecimiento es asociado con la hiperplasia fibrilar (Weatherley y Gill, 1987; Higgins y Thorpe, 1990).

La **longitud corporal** durante esta etapa se mantuvo prácticamente constante (4-5mm. en todas las poblaciones) y no se vio influenciada por la temperatura, tal y como ha sido encontrado en otras especies como en *S. salar* (Ryzhkov, 1976, citado por Kamler, 1992), y *S. trutta* (Zalicheva, 1981, citado por Kamler, 1992), en las que la temperatura no modificó el tamaño a la eclosión. Asimismo, en ejemplares de *S. maximus*, la temperatura no influyó sobre la longitud en el momento de la reabsorción del saco vitelino (Quantz, 1985, citado por Kamler, 1992). No obstante, el comportamiento de este parámetro no es uniforme en todas las especies, ni dentro de una misma especie. Así, en estudios realizados en *S. salar* por Nathanailides *et al.* (1995a), y en otras especies (Vieira y Johnston, 1992; Gibson y Johnston, 1995) las bajas temperaturas aumentaron el período de incubación, lo que fue acompañado de una mayor longitud a la eclosión.

Por último, cabe señalar que, independientemente del efecto de la temperatura, y,

considerando conjuntamente todos los lotes que integran cada población estudiada, se observan también diferencias intraespecíficas en algunos parámetros. Así, por ejemplo, el número de fibras a la apertura de la boca fue mayor en ejemplares de *D. labrax* atlántica de 1997 que en *D. labrax* mediterránea de 1997; esta última, sin embargo, presentó un área fibrilar mayor en dicho estadío. En otras especies se han encontrado resultados similares. Concretamente, algunos estudios ponen de manifiesto importantes diferencias en el número de fibras blancas entre diferentes stocks de *C. harengus*. Por ejemplo, *C. harengus* Blackwater, un stock de estuario que se desarrolla normalmente en aguas más frías que *C. harengus* Bank, presenta hasta 1.9 veces más fibras musculares al alcanzar la madurez biológica (Greer-Walker *et al.*, 1972). A este respecto, Johnston (1993) sugiere que las diferencias en el número de fibras entre poblaciones de una misma especie, podrían ser el resultado de las interacciones entre factores medioambientales y el desarrollo, así como de las influencias genéticas.

En definitiva, las diferentes poblaciones de *D. labrax* estudiadas muestran una **gran variabilidad intraespecífica en su respuesta a la temperatura**. Dicha variabilidad es referida, principalmente, a la **contribución relativa de la hipertrofia e hiperplasia al crecimiento del miotomo, en las fases embrionaria y prelarvaria, ante las diferentes temperaturas**. En este sentido, Johnston y Mclay (1997) obtuvieron resultados semejantes en 5 familias de *S. salar*, de tal forma que las principales diferencias fueron referidas a la participación de ambos mecanismos de crecimiento en la eclosión y al inicio de la alimentación externa. Estos autores atribuyeron dicha variabilidad interfamiliar, al tamaño y calidad del huevo, que varían entre poblaciones, y que influyen en el crecimiento y tamaño larvarios. Otros estudios en *S. salar* atlántico han mostrado diferencias en la supervivencia, crecimiento, y maduración de peces juveniles y adultos, atribuibles a influencias parentales e interacciones genotipo-medioambiente (Thorpe y Morgan, 1978; Hanke *et al.*, 1989; Herbinger y Newkirk, 1990; Wild *et al.*, 1994). En *C. harengus* han sido encontradas también variaciones interanuales (Vieira y Johnston, 1992; Johnston, 1993; Johnston *et al.*, 1995) que pueden reflejar variaciones genéticas y/o variaciones en la calidad del huevo (Johnston *et al.*, 1996).

Las diferencias debidas a factores genéticos se ponen de manifiesto indirectamente cuando diferentes líneas genéticas se someten a las mismas condiciones medioambientales (Atkinson, 1996). De acuerdo con esto, la diferente respuesta en el crecimiento entre *D.*

labrax atlántica y mediterránea (1997) de nuestro estudio (sometidas a condiciones de temperatura semejantes, y procedentes de reproductores genéticamente distintos), puede ser debida, al menos en parte, a la interacción entre el genotipo y el medio ambiente, descrita para otras especies. A este respecto, Johnston (1999) sugiere que los factores externos, tales como temperatura, luz, niveles de oxígeno, alimentación y natación pueden interactuar con el genotipo, dando lugar a variaciones en la contribución hiperplásica al crecimiento del miotomo.

Por otra parte, se ha observado que las temperaturas medioambientales pueden producir una selección de determinados genotipos a lo largo de varias generaciones (Atkinson, 1996). Según esto último, las diferencias genéticas halladas entre los reproductores de *D. labrax* atlántica y mediterránea podrían ser atribuidas a un fenómeno de adaptación a su medio ambiente natural, ya que las temperaturas que se alcanzan en el océano atlántico son menores que las que se alcanzan en las costas mediterráneas. No obstante, las diferencias entre los stocks analizados podrían ser también debidas a la deriva genética, y haría falta profundizar más en este tipo de estudios para poder evaluar la interrelación genotipo-medioambiente.

V-3.2. DESDE EL COMIENZO DE LA ALIMENTACIÓN VIVA HASTA EL DESTETE.

Durante la alimentación exógena, la tasa de crecimiento es particularmente sensible a los efectos de la temperatura, calidad y cantidad de alimento (Kamler, 1992). En nuestro estudio, tras dos semanas de **alimentación viva** (15-20 días), comenzó a aumentar considerablemente la hipertrofia e hiperplasia fibrilares de los músculos blanco y rojo, viéndose ambos fenómenos correlacionados positivamente con las altas **temperaturas de cultivo**. Con el comienzo de la **alimentación inerte** (inicio del destete), continuó la misma tendencia y así, las altas temperaturas de cultivo aumentaron tanto la hipertrofia como la hiperplasia fibrilares, siendo este efecto más significativo sobre el número de fibras, tal y como reveló el análisis estadístico.

La mayor influencia de la temperatura sobre el número de fibras durante esta etapa, va asociada a una mayor tasa o velocidad de crecimiento muscular y corporal en las larvas cultivadas a altas temperaturas. Estos resultados han sido también descritos en *S. salar* (Johnston y Mclay, 1997), y coinciden con el hecho general encontrado en peces

juveniles, cuyo rápido crecimiento es asociado con la hiperplasia fibrilar (Weatherley y Gill, 1987; Higgins y Thorpe, 1990).

Por tanto, el efecto de la temperatura sobre la dinámica de crecimiento en esta etapa, es diferente del observado en la fase vitelina, en la que el principal mecanismo de crecimiento del miotomo era la hipertrofia, viéndose en general más influida por la temperatura que la generación de fibras. Sin embargo, tras esa fase, la hiperplasia adquiere un papel predominante en la dinámica de crecimiento, manifestando una gran sensibilidad a las altas temperaturas. De igual forma, algunos estudios en *S. salar* ponen de manifiesto que, tras la reabsorción del saco vitelino, los mecanismos de crecimiento muscular y el efecto de la temperatura sobre ellos, difieren del comportamiento muscular en los estadios iniciales de desarrollo. Así, en esta especie, Johnston y Mclay (1997) encontraron que durante el período de incubación las altas temperaturas fueron acompañadas de una menor hipertrofia e hiperplasia fibrilares, pero en la fase larvaria, ambos parámetros aumentaron a altas temperaturas.

Por otro lado, en esta etapa las **longitudes y pesos** corporales de larvas cultivadas a altas temperaturas fueron significativamente mayores que en larvas cultivadas a temperatura ambiente, coincidiendo con estudios previos en esta especie (Alliot *et al.*, 1983), y en otras especies, como *C. harengus* (Johnston *et al.*, 1998).

El efecto que ejerce la temperatura sobre el crecimiento durante la fase larvaria, puede ser interpretado en función de diversos aspectos relacionados con el desarrollo larvario y el comportamiento alimentario. Por un lado, existe una interacción temperatura-alimentación, tal y como ha sido descrito por diversos autores en otras especies. Así, Atkinson (1996) encontró que un aumento de la temperatura generalmente incrementa el grado de crecimiento cuando los recursos son abundantes, y esto es lo que hemos constatado en el tejido muscular, ya que los recursos alimenticios no estuvieron limitados en ningún momento. Por otra parte, la interacción temperatura/alimentación, puede, a su vez, estar acompañada por la aceleración en el desarrollo de estructuras relacionadas con la alimentación y la respiración, tal y como encontraron Hunt Von Herbing *et al.* (1996) en huevos de dos poblaciones genéticamente distintas de *G.*

morhua, sometidos a 10 °C y 5 °C. Estos autores observaron que, durante el período de alimentación endógena, dichas estructuras estaban presumiblemente controladas en gran parte por factores intrínsecos (genéticos), mostrando menor sensibilidad a la temperatura. Sin embargo, cuando predomina la comida exógena, los factores extrínsecos como la temperatura juegan un papel más importante sobre el desarrollo larvario, mostrándose influido por una combinación de factores intrínsecos (genéticos) y extrínsecos (medioambientales).

Es importante resaltar que, mientras en las fases iniciales del desarrollo (de alimentación endógena), se observaban diferencias en el comportamiento de la musculatura de las distintas poblaciones de *D. labrax* frente a la temperatura, en esta etapa de rápido crecimiento, todas ellas responden de forma similar. De acuerdo con los resultados hallados por Hunt von Herbing *et al.* (1996), podemos pensar que las diferencias observadas entre las poblaciones de *D. labrax* en la fase inicial del desarrollo podrían atribuirse en gran medida a diferencias genéticas, mientras que, con el comienzo de la alimentación externa, incrementa la influencia de la temperatura. Consecuentemente, al disminuir la influencia genética en esta etapa, la respuesta del crecimiento muscular frente a la temperatura es más homogénea entre los lotes poblacionales.

Por otra parte, durante esta etapa la **temperatura de incubación** fue capaz de marcar algunas diferencias entre los *ejemplares cultivados a temperatura ambiente*, aunque estas diferencias sólo fueron significativas en muy pocos casos. Así, a los 50 días, el número de fibras blancas de las larvas de *D. labrax* de 1996 sometidas a 17 °C/ambiente, fue significativamente mayor que a 15 °C/ambiente. Esta tendencia fue también puesta de manifiesto al comienzo del destete en algunos parámetros musculares de *D. labrax* atlántica y mediterránea de 1997, aunque no llegó a ser significativa.

Por otro lado, al comparar los datos obtenidos a 19 °C de incubación (prueba adicional de 1998) con el resto de poblaciones a las que se les aplicó menor temperatura de incubación (1996 y 1997), encontramos diferencias significativas con la población de 1996. Así, desde los 20 días, la hipertrofia e hiperplasia fibrilares son significativamente mayores a 19 °C/ambiente (1998) que en los ejemplares sometidos a 17 °C/ambiente y 15 °C/ambiente de la población de 1996. Con el resto de poblaciones (1997), aunque se observaron algunas diferencias, éstas no fueron muy relevantes. Como ya se ha comentado en la exposición de los resultados, la comparación entre diferentes

poblaciones conlleva la introducción de nuevas fuentes de variación, tales como diferencias genéticas, calidad de la puesta, etc., por lo que, considerar este resultado como un efecto de la temperatura de incubación puede no corresponderse completamente con la realidad. Necesitaríamos, por tanto de otras pruebas adicionales para comprobar y profundizar en el efecto que ejerce la aplicación de elevadas temperaturas de incubación (19 °C) sobre la dinámica de crecimiento de *D. labrax*.

V-3.3. FINAL DEL DESARROLLO LARVARIO.

La metamorfosis larvaria conlleva una serie de cambios anatómicos, funcionales y de comportamiento que finalizan con la escamación, hecho biológico que marca el comienzo de la etapa postlarvaria. El final de la metamorfosis larvaria marca una etapa fundamental desde el punto de vista eco-etológico de *D. labrax*. En este período, *D. labrax*, hasta ahora pelágica, se vuelve demersal, y generalmente vivirá cerca del fondo. En este momento la especie adquiere el carácter ubicuista (Barnabé, 1991).

En este estadio de desarrollo, hemos observado **variaciones intraespecíficas** en la respuesta de los mecanismos de crecimiento muscular frente a la temperatura y su contribución al área total del miotomo. Así, en el lote atlántico se observa mayor influencia de la temperatura de cultivo sobre el crecimiento hiperplásico del miotomo que en el lote mediterráneo. En consecuencia, las principales variaciones intraespecíficas son referidas principalmente a la **contribución relativa de la hipertrofia e hiperplasia al total del miotomo**, tal y como ya se puso de manifiesto en la fase vitelina. Estas variaciones pueden estar relacionadas, como ya sugerimos, con las diferencias genéticas entre *D. labrax* atlántica y mediterránea, tal y como encontraron Johnston y Mclay (1997) en 5 familias de *S. salar*. No obstante, y coincidiendo con los resultados hallados por estos investigadores, en nuestro estudio se observa que el efecto de la temperatura de cultivo prevalece sobre el efecto familiar. En este sentido, la velocidad de crecimiento de ambas poblaciones de *D. labrax* describe unas características generales que definen una respuesta común a la temperatura. Así, la tasa hiperplásica es mayor en todos los ejemplares de ambas poblaciones cultivados a altas temperaturas, los cuales alcanzaron el final de la metamorfosis más rápidamente que los ejemplares cultivados a temperatura ambiente.

Estos resultados ponen de manifiesto que, **la velocidad de crecimiento muscular viene determinada por la dinámica de crecimiento (hipertrofia/hiperplasia)**, tal y como ha sido constatado por Weatherley y Gill (1987). A su vez, **el efecto de la temperatura de cultivo sobre la velocidad de crecimiento muscular, semejante en ambas poblaciones, está en relación directa con la generación de fibras**, coincidiendo con previos estudios en alevines de esta especie (Nathanailides *et al.*, 1996) y en las larvas de otras especies como *S. maximus* (Gibson y Johnston, 1995), *C. carpio* (Nathanailides *et al.*, 1995b) y *S. salar* (Johnston y Mclay, 1997).

Por otra parte, considerando conjuntamente todos los lotes que componen cada población, se aprecia que, tras la fase vitelina, y hasta el final del desarrollo larvario, el crecimiento fue mayor en *D. labrax* mediterránea que en *D. labrax* atlántica, en todos los parámetros, excepto en la hiperplasia del músculo blanco. No obstante, como veremos posteriormente, los mejores resultados de crecimiento de *D. labrax* mediterránea fueron acompañados de una alta mortalidad en esta población, por lo que el mayor crecimiento pudiera estar relacionado con una menor densidad de cultivo en *D. labrax* mediterránea (ocasionada por dicha mortalidad), y con ello una menor competencia por el espacio y el alimento en cada tanque experimental. No obstante, no podemos precisar los factores que pudieron haber actuado, ya que no fueron objeto de nuestro estudio. En este sentido, Weatherley y Gill (1987) señalan la existencia de numerosos factores, tales como diferencias en la densidad de cultivo, genéticas, etc., que provocan grandes variaciones entre las poblaciones.

Por otro lado, esta especie presenta un elevado crecimiento potencial, ya que continúa generando fibras hasta los $\cong 48$ cm. (Veggetti *et al.*, 1990), por lo que, aunque a partir de nuestros resultados no podemos concluirlo, pensamos que el menor crecimiento de *D. labrax* atlántica podría ser recuperado en fases posteriores de cultivo (García-Alcázar *et al.*, 1999); sobre todo, teniendo en cuenta que la generación de fibras de *D. labrax* atlántica fue muy elevada a lo largo de todo el desarrollo larvario, y en opinión de diversos autores (Johnston *et al.*, 1982; Weatherley y Gill, 1987), el número de fibras es el principal parámetro implicado en el potencial de crecimiento futuro, ya que el área fibrilar tiene un máximo fisiológico.

De acuerdo con las características de crecimiento potencial que presenta esta especie, sería necesario ampliar nuestro estudio hasta los estadíos más avanzados de su

crecimiento, para conocer el grado de influencia de la temperatura sobre el crecimiento máximo que es capaz de alcanzar *D. labrax*. No obstante, en aguas europeas se ha visto que *D. labrax*, aunque crece más rápidamente en el Sur que en el Norte, el tamaño final alcanzado (aproximadamente 90 cm.), es similar entre ellas. La variabilidad de crecimiento en *D. labrax* de ambos orígenes geográficos puede ser debida a factores medioambientales, en particular, la temperatura, y factores biológicos, tales como la comida y la competición interespecífica (Barnabé 1976b, citado en Picket y Pawson, 1994).

El músculo rojo muestra la misma tendencia que el blanco ante los diferentes regímenes de temperatura, pero el análisis estadístico no manifiesta diferencias significativas. La participación de este músculo en el crecimiento total del miotomo es menor que la del músculo blanco, y sus características morfológicas y funcionales no se adquieren completamente hasta el final de la metamorfosis. Por tanto, en este músculo prevalecen los fenómenos de desarrollo sobre el crecimiento, lo que puede motivar la menor sensibilidad de sus parámetros a la temperatura. Esto está relacionado con el hecho observado en numerosas especies de que el desarrollo es más sensible a la temperatura que el crecimiento (Atkinson, 1996), de tal manera, que cuando prevalecen los fenómenos de desarrollo, la influencia de la temperatura sobre el crecimiento puede ser menor.

La población de *D. labrax* de 1996 alcanzó el final de la metamorfosis con 3 ± 0.4 cm., mientras que la población de 1997 completó la metamorfosis larvaria en menos tiempo, lo que fue acompañado de una menor longitud (2 ± 0.5 cm) y menor crecimiento final del miotomo que en 1996. La precocidad que manifestó el lote de 1997 ha sido descrita en diversas poblaciones de *D. labrax* (Barnabé, 1991), y en ella pueden estar involucrados diversos factores, tales como variaciones en la calidad de la puesta, y la interrelación entre diferentes regímenes de temperatura y de alimentación.

Por otro lado, las altas temperaturas de cultivo aumentaron el tamaño final del miotomo de las larvas de *D. labrax* de 1996 de forma más significativa que en la población

de 1997. Esto puede estar relacionado con las diferentes temperaturas de cultivo empleadas (17 °C y 19 °C, en 1996 y 1997, respectivamente), de tal forma que las larvas sometidas a 19 °C finalizaron la metamorfosis muy pronto (a los 52 días), mientras que las larvas cultivadas a 17 °C culminaron su desarrollo larvario a los 78 días. El hecho de que las altas temperaturas aceleren el desarrollo puede implicar, en ocasiones, un menor crecimiento al final de un estadio de desarrollo dado, alterando con ello, la ratio desarrollo/crecimiento (Atkinson, 1996). Esto puede explicar los resultados hallados al final de la metamorfosis de *D. labrax* de 1997, de tal forma que, las altas temperaturas empleadas en esta población (19 °C), si bien motivaron un mayor crecimiento en el lote atlántico, esto no ocurrió en el lote mediterráneo, que alcanzó el mayor crecimiento muscular a 17 °C/ambiente.

o EFECTO DE LA EXPERIENCIA TÉRMICA INICIAL (T^a INCUBACIÓN) SOBRE EL CRECIMIENTO MUSCULAR AL FINAL DE LA METAMORFOSIS.

En este apartado discutimos la influencia que ejerce la temperatura aplicada durante el período embrionario, sobre el crecimiento muscular alcanzado al final del desarrollo larvario.

En larvas pertenecientes a la población de 1996 no se detectó influencia de la temperatura de incubación al final del desarrollo larvario, aunque en este caso sólo pudo cuantificarse el área total del miotomo.

En la población de 1997, sí se midieron todos los parámetros musculares, y se halló la existencia de una interacción T^aincubación*T^acultivo, lo que indica que la temperatura de incubación no actúa de igual forma en todos los ejemplares, sino que su efecto depende de las condiciones de cultivo posteriores a la eclosión. Así, mientras que en *larvas cultivadas a 19 °C* no se aprecia una influencia significativa de la temperatura de incubación, en *larvas cultivadas a temperatura ambiente* se observa que el incremento de la temperatura de incubación ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento de sus parámetros musculares al final del desarrollo larvario. El análisis estadístico de estos resultados revela que esta interacción T^ainc*T^acultivo es significativa para el área de las fibras blancas de *D. labrax* atlántica y mediterránea, y para el área total del miotomo de *D. labrax* mediterránea.

Esta tendencia comenzó a detectarse en el estadio anterior, pero es en este momento cuando se hace más manifiesta, lo que refleja un efecto gradual y tardío de la temperatura

de incubación, tal y como se ha demostrado en *C. harengus* (Johnston *et al.*, 1998). En esta especie dichos autores realizaron un primer experimento, en el que los ejemplares fueron incubados a diferentes temperaturas (5, 8 y 12 °C), manteniéndolos a temperatura ambiente tras la eclosión. Los parámetros musculares fueron mayores en las larvas incubadas previamente a mayor temperatura, pero estas diferencias no fueron significativas hasta después de la metamorfosis. En un segundo experimento, estos autores mantuvieron las larvas de *C. harengus* a diferentes temperaturas hasta el inicio de la comida, momento en que se transfirieron todas a temperatura ambiente. En este último experimento las secciones transversales de los músculos blanco y rojo fueron mayores en los ejemplares sometidos inicialmente a mayores temperaturas, pero estas diferencias no se apreciaron hasta que transcurrieron 60-80 días desde la transferencia. En base a estos resultados, Johnston *et al.* (1998) demuestran que la experiencia térmica inicial modula la tasa de generación de fibras y la hipertrofia a lo largo de la fase larvaria. A este respecto, en los ejemplares de *D. labrax* atlántica y mediterránea de nuestro estudio, los histogramas de tamaños fibrilares al final de la metamorfosis muestran un alto porcentaje de fibras pequeñas de nueva generación ($<100 \mu\text{m}^2$) a todas las temperaturas, con la excepción de los ejemplares mantenidos a 15 °C/ambiente de *D. labrax* atlántica. Esto pone de manifiesto que el potencial de fibras podría venir determinado, al menos en parte, por la historia térmica inicial a la que fueron sometidos los ejemplares, tal y como sugirieron Johnston *et al.* (1996, 1998). El mecanismo por el que esta influencia tiene lugar es prácticamente desconocido, pero estos autores sugieren, que podrían estar involucradas alteraciones en el número de las células precursoras de las fibras musculares y/o en el número y propiedades de los numerosos tipos celulares implicados en la regulación del crecimiento muscular (ver Fig. 1).

De acuerdo con los resultados hallados en *C. harengus*, el efecto de la temperatura de incubación observado en esta especie es más significativo que el que hemos encontrado en *D. labrax*, ya que nuestros resultados no muestran un efecto significativo de la temperatura de incubación en todos los parámetros, ni en todos los lotes estudiados. Una posible explicación a este hecho es el breve período de incubación de *D. labrax* (3-5 días), lo que implica que las larvas eclosionen con cierto grado de inmadurez fibrilar. Sin embargo, en *C. harengus* el período de incubación dura aproximadamente 10-25 días (según la temperatura), con lo que la miogénesis y la inervación de los miotomos están completados antes de la eclosión. Probablemente, si hubiéramos mantenido las altas temperaturas de incubación hasta la diferenciación completa de las fibras en *D. labrax*, los

efectos hubieran sido más manifiestos. Esto, junto con el hecho de que los incrementos de temperatura aplicados en nuestro estudio fueron sólo de $\cong 2$ °C por encima de la temperatura ambiente, puede explicar que nuestros resultados fueran menos relevantes.

Por otro lado, tal y como indicamos anteriormente, *en larvas cultivadas a altas temperaturas* tras la eclosión, no se detecta un efecto significativo de la temperatura de incubación. Esto puede ser debido a que la temperatura de cultivo ejerce un efecto inmediato y directo sobre el crecimiento, desde que las larvas empiezan a comer, por lo que la temperatura de incubación, cuyo efecto es gradual, no llega a apreciarse en estas larvas.

V-3.4. FASE POSTLARVARIA.

Tras la escamación, a los 90 y 120 días (*D. labrax* de 1997 y de 1996 respectivamente) se aprecia un considerable aumento del crecimiento muscular, así como de las longitudes y pesos corporales, siendo significativamente mayor en los ejemplares cultivados a mayor temperatura. El crecimiento muscular observado en todos los lotes, una vez finalizada la metamorfosis larvaria, se corresponde con el propio de las **fases de rápido crecimiento**. Estas fases se suceden de forma característica una vez que se ha completado un determinado estadio de desarrollo. A este hecho hay que unir la influencia del comportamiento natatorio y alimenticio, que es más activo en estas fases que en las etapas de desarrollo larvario, viéndose, a su vez, influido por las altas temperaturas, que incrementan tanto la ingesta como la actividad natatoria (Fry, 1971; Moksness *et al.*, 1995).

El efecto de la temperatura durante el período postlarvario coincide con los resultados hallados en otros estudios. Así, Nathanailides *et al.* (1996) sometieron alevines de *D. labrax* a diferentes temperaturas, y encontraron que el mayor crecimiento se daba a mayor temperatura dentro de su rango óptimo (20-26 °C), merced a un aumento significativo en el número de fibras del miotomo.

No obstante, aparte de la influencia de la temperatura, hay que considerar que los ejemplares cultivados a altas temperaturas de nuestro estudio alcanzaron el final de la metamorfosis antes, con lo que, a una misma edad, son fisiológicamente mayores que las larvas mantenidas a temperatura ambiente.

V-4. SUPERVIVENCIA LARVARIA. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

En diversas especies se ha encontrado que los defectos embrionarios transmitidos a partir de los padres, o adquiridos durante los estadios de desarrollo temprano, pueden resultar en un fracaso del desarrollo normal y, finalmente, en mortalidad, que se manifiesta en los períodos críticos (eclosión, inicio de la comida externa, y, en general en los períodos de transición entre dos estadios distintos de desarrollo) (Kamler, 1992). En la experiencia llevada a cabo en 1997, la supervivencia de las larvas de *D. labrax* atlántica fue considerablemente mayor que la encontrada en *D. labrax* mediterránea. La puesta obtenida en *D. labrax* mediterránea de 1997 no debió reunir todas las condiciones necesarias para garantizar la viabilidad futura larvaria, ya que se obtuvieron supervivencias muy inferiores a los valores estándar obtenidos en el cultivo de esta especie.

La calidad del desove está influida por un efecto combinado de propiedades endógenas de los desovadores (factores internos), y de factores externos. Los trabajos realizados hasta el momento sobre estos aspectos, consideran los períodos críticos de supervivencia conectados principalmente con factores endógenos de los progenitores (Kamler, 1992). Se sabe que el peso y la edad de los reproductores son muy importantes para la supervivencia de la progenie, pero estos dos factores fueron similares entre ambos stocks de reproductores, por lo que otros aspectos pudieron estar involucrados en la calidad de la puesta de *D. labrax* mediterránea. Las variables que caracterizan la calidad de la puesta fueron completamente contrastadas en el I.E.O. (Centro oceanográfico de Murcia), por lo que creemos que la baja supervivencia estuvo relacionada con factores internos de los desovadores no apreciables con las técnicas que se usan actualmente para la valoración de la puesta. Gran parte de la investigación actual está centrada en la evaluación de los distintos parámetros que influyen en la calidad de la puesta ya que, a nivel productivo, resulta más rentable eliminar las puestas de mala calidad, que conservarlas y obtener una baja viabilidad.

La baja supervivencia de *D. labrax* mediterránea fue acompañada de un mayor crecimiento muscular y corporal que en *D. labrax* atlántica. A este respecto pensamos que

la alta mortalidad de *D. labrax* mediterránea pudo dar lugar a variaciones en las condiciones de cultivo, como una menor densidad de ejemplares por tanque. Esto, a su vez, podría explicar el mayor crecimiento encontrado en esta población, provocado por una menor competencia por el alimento y el espacio. Por tanto, los mejores resultados de crecimiento absoluto alcanzados por *D. labrax* mediterránea podrían estar asociados a las circunstancias descritas, y no a un mejor crecimiento intrínseco a esta población.

Por otro lado, tanto en *D. labrax* atlántica como en *D. labrax* mediterránea, la supervivencia fue menor en larvas cultivadas a mayor temperatura que en larvas mantenidas a temperatura ambiente. Se sabe que el rango de temperaturas que permite el desarrollo es generalmente más amplio para larvas que para embriones, y es aún mayor para juveniles (Rombough, 1988). En general, las altas temperaturas van asociadas a mayor mortalidad, y así, los huevos de *C. harengus* pueden eclosionar a 4 °C y 15-17 °C, pero su supervivencia es menor a mayor temperatura (Johnston *et al.*, 1996).

Aunque el efecto de la temperatura de incubación sobre la supervivencia ha sido muy estudiado, el comienzo de la comida exógena podría ser más decisivo para la vida larvaria que el tiempo para eclosionar (Balon, 1985). Fukuhara (1990) estudió el efecto de la temperatura sobre larvas de diferentes especies marinas durante la fase de alimentación endógena (vitelina), y observó un aumento de la mortalidad a mayor temperatura. Polo *et al.* (1991) mantuvieron larvas de *S. aurata* entre 12-30 °C, desde la fertilización hasta la reabsorción del saco vitelino, y hallaron la mayor supervivencia a temperaturas intermedias (16 y 22 °C), obteniendo el mejor índice de conversión del saco vitelino a 16 °C.

Diversos autores han comprobado que la larva aguanta sin comer más tiempo a bajas temperaturas (Blaxter y Hempel, 1963; Lasker *et al.*, 1970; Jones, 1972, citados por Kamler, 1992), y esto puede explicar los resultados hallados en *S. aurata* por Polo *et al.* (1991), y en otras especies por Fukuhara (1990), de manera que el óptimo de temperatura es menor durante la fase prelarvaria o de alimentación endógena, que posteriormente. En las larvas de *D. labrax* de nuestro estudio cultivadas a altas temperaturas se observa que la reabsorción del saco vitelino es muy rápida (3-4 días), lo que pone de manifiesto una aceleración del metabolismo que podría ser perjudicial para el aprovechamiento de las reservas vitelinas durante esta fase, en la que la larva no recibe alimentación exógena. Por su parte, Covès *et al.* (1991) describen en *D. labrax* temperaturas óptimas para el cultivo y la supervivencia de 15-16 °C, desde la fertilización hasta los 4-5 días tras la eclosión, momento en que comienzan a aplicar aumentos graduales de temperatura hasta llegar a

los 19 y 20 °C a los 15 y 20 días, respectivamente. Según estos precedentes y en base a nuestros resultados, pensamos que la temperatura de 19 °C aplicada sobre las larvas de *D. labrax* durante la fase vitelina, se encuentra por encima del rango óptimo para las fases iniciales de vida larvaria.

Otro factor a tener en cuenta es el nivel de desarrollo muscular que presentan las diferentes especies a la eclosión. En *C. harengus*, con un período de incubación largo, la miogénesis y la inervación de los miotomos están bien completados antes de la eclosión. Sin embargo, en *D. labrax*, la eclosión tiene lugar mucho antes, lo que va asociado a cierto grado de inmadurez muscular. Johnston *et al.* (1996) sugieren que algunos cambios en el tiempo relativo de desarrollo de las fibras musculares y neuronas motoras, por efecto de la temperatura, pueden producir diferentes fenotipos funcionales, lo que puede influir en la tasa de mortalidad. Aunque se requieren rigurosos experimentos para profundizar en esta idea, éstos serían de gran utilidad para la acuicultura, dado el bajo porcentaje de larvas de peces marinos que llegan a adultos.

El efecto de la temperatura sobre la tasa metabólica de poiquilotermos acuáticos ha sido objeto de numerosos estudios, encontrando la existencia de un rango de temperatura, dentro del cual el metabolismo es menos dependiente de la temperatura que en rangos más fríos o más calientes (Stroganov, 1956; Duncan y Klekowski, 1975; Galkovskaya y Suschenya, 1978; Wieser y Forstner, 1986, citados por Kamler, 1992). No obstante, los estudios realizados sobre los límites de tolerancia encontrados para cada especie, presentan cierta variabilidad. Así, para *S. aurata*, el rango de temperatura óptimo encontrado por Polo *et al.* (1991) difería del encontrado por Camus y Koutsikopoulos (1984), pero en ambos casos los valores están cerca de la temperatura a la que los reproductores fueron mantenidos. En *S. solea* también se han encontrado diferencias en los límites de tolerancia, y esto ha sido relacionado con la temperatura natural de desove en cada latitud. Por otra parte, se ha comprobado también que los cambios de temperatura que imitan el curso natural de la temperatura incrementan la supervivencia (Kokurewicz *et al.*, 1980; Lebedeva, 1981, citados por Kamler, 1992). De acuerdo con estos hechos, la mayor supervivencia de las larvas de *D. labrax* cultivadas a temperatura ambiente podría guardar relación con el hecho de tratarse de la misma temperatura a la que se mantuvieron los reproductores, así como con el aumento gradual que experimenta la temperatura ambiente, que se corresponde con la natural del mar en esa época del año.

De igual forma, en el experimento de 1996, aunque la supervivencia de *D. labrax* no fue contabilizada, en general se observó una mayor supervivencia en las larvas mantenidas a temperatura ambiente, fundamentalmente en las sometidas a 15 °C/ambiente.

VI.-RESUMEN

VI.-RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la temperatura de incubación y cultivo sobre el desarrollo y el crecimiento muscular de *Dicentrarchus labrax*. Para ello, se han realizado diversas experiencias, combinando diferentes temperaturas: $\cong 15$ °C (temperatura ambiente) 17 y 19 °C. En uno de dichos experimentos se valoró comparativamente el efecto de la temperatura sobre dos poblaciones de *D. labrax* procedentes de reproductores genéticamente distintos (lotes atlántico y mediterráneo).

Las muestras se tomaron en distintos momentos del desarrollo larvario, y en la fase postlarvaria, a partir de ejemplares de *D. labrax* procedentes del Centro Oceanográfico de Murcia (Instituto Español de Oceanografía; Planta de Cultivos Marinos de Mazarrón). La cuantificación del crecimiento de la musculatura lateral se realizó mediante análisis morfométrico del área media y número de fibras, y el área total de los músculos blanco y rojo. Asimismo, se midieron la longitud, el peso, el diámetro de los huevos de la puesta y la longitud del saco vitelino de las larvas.

Los resultados muestran que, tal y como se ha descrito en otras especies, el desarrollo y el crecimiento larvario de *D. labrax* van unidos, de tal modo que las altas temperaturas dan lugar a una aceleración de ambos procesos. No obstante, dicha

aceleración no siempre va acompañada de un mayor crecimiento neto al final de cada estadio de desarrollo (eclosión, apertura de la boca, escamación).

Las temperaturas de incubación y de cultivo modulan las tasas de hipertrofia e hiperplasia muscular de *D. labrax* a lo largo del desarrollo larvario. Durante la fase de alimentación endógena la temperatura incrementa preferiblemente la hipertrofia fibrilar, observándose una fuerte disminución de la tasa hiperplásica en la fase prelarvaria, con independencia de la temperatura. Con el inicio de la alimentación viva comienza una etapa de rápido crecimiento en la que las altas temperaturas de cultivo incrementan principalmente la hiperplasia fibrilar. La distinta sensibilidad que muestran los parámetros musculares frente a la temperatura da lugar a diferencias significativas en la constitución fibrilar del miotomo en cada régimen de temperatura, aunque al final de cada estadio de desarrollo el crecimiento total del miotomo puede ser similar.

Los lotes atlántico y mediterráneo mostraron un comportamiento semejante frente a la temperatura durante las fases de rápido crecimiento (larvario y postlarvario). Sin embargo, al final de cada estadio de desarrollo se apreciaron diferencias en la influencia de la temperatura sobre la hipertrofia e hiperplasia fibrilares y su contribución relativa al total del miotomo. En este sentido, al final de la metamorfosis larvaria, la hiperplasia estuvo más influida por la temperatura en el lote atlántico que en el mediterráneo, posiblemente debido a la interacción del genotipo con la temperatura.

La aplicación de pequeños incrementos de temperatura durante el corto período de incubación de *D. labrax* aumentó el crecimiento larvario posterior. Dicho efecto fue gradual, manifestándose principalmente al final de la metamorfosis larvaria. Sin embargo, las altas temperaturas de cultivo ejercieron una influencia más inmediata, aumentando significativamente el crecimiento del miotomo en poco tiempo. Como consecuencia de la interacción de ambas temperaturas (incubación y cultivo), el efecto positivo de la temperatura de incubación se manifestó principalmente en los ejemplares que fueron posteriormente cultivados a temperatura ambiente. Este hecho, unido a que los ejemplares cultivados a temperatura ambiente mostraron los mayores índices de supervivencia, indican que la combinación de temperaturas 17 °C/ambiente fue la más idónea en este estudio.

VI.-SUMMARY

The combined effect of incubating and rearing temperatures on the development and muscle growth of *Dicentrarchus labrax* larvae are studied in this work. Several experiences were carried out combining different temperatures: $\cong 15$ °C (ambient), 17 and 19 °C. In one of these experiments the combined effect of temperature and genotype was studied comparing two populations of *D. labrax* (Atlantic and Mediterranean stocks), obtained from genetically different progenitors.

Since hatching to the postlarval stage fish samples were obtained from the Centro Oceanográfico of Murcia (Spanish Institute of Oceanography; Planta de Cultivos Marinos de Mazarrón) at critical moments of the larval development. Axial muscle growth was measured by morphometric analysis of the following parameters: average area and total number of white and red muscle fibres, and total white and red muscle areas. The length, weight, diameter of the eggs and yolk sac were also measured.

As it has been described in other species both development and muscle growth of *D. labrax* are directly related. Thus, the high temperatures accelerated both processes.

Nevertheless, this acceleration did not always result in a greater net growth at the end of each developmental stage (hatching, mouth opening, scaling).

The results shows the temperature modulates the rates of white and red muscle's hypertrophy and hyperplasia throughout the larval development. During the endogenous feeding stage the temperature preferently increased muscle fibres hypertrophy. In the prelarval stage the muscle fibre hyperplasia almost ceased, and this fact was hardly modified by the rearing temperature. Later, during the rapid growth stage of external feeding, the hyperplastic growth of the myotome was significantly higher in the warm reared fishes (17 and 19 °C). Although at the end of each developmental stage the total growth of the myotome could be similar in fishes reared under different thermal regimes, the muscle cellularity of the myotome showed significative differences.

Muscle growth dynamics were very similar in the Atlantic and Mediteranean stocks during most of the larval and early stages of the postlarval phase (rapid muscle growth periods). However, at the end of each developmental stage the relative contribution of the hypertrophy and hyperplasia of the white and red muscles to the total myotomal growth differed between both stocks. Thus, white muscle's hyperplastic rate was more influenced by the rearing temperature in the Atlantic than in the Mediterranean stock. It is likely to think that part of this effect is due to a different interaction between the genotype and the temperature in each stocks.

The application of small increases of temperature during the short incubating period of *D. Labrax* resulted in a gradual higher growth rate at the end of the larval development. However, the rearing temperatures had a quicker and more marked effect on the growth of the myotome. As a consequence of the interaction between the incubating and rearing temperatures, the positive effect of a slightly elevation of the incubating temperature was mainly observed after rearing the fishes in ambient temperatures. Since tanks reared at ambient temperature showed the greatest survival rates, it is likely to refer the 17 °C/ambient combination of temperatures as the most suitable in this study.

VII.-CONCLUSIONES

VII.-CONCLUSIONES

1^a) Las tasas de desarrollo larvario y de crecimiento muscular de *D. labrax* están positivamente relacionadas con la temperatura, de tal forma que las altas temperaturas acortan el tiempo necesario para completar cada período de desarrollo (embrionario, prelarvario y larvario), y aumentan la velocidad de crecimiento muscular. La aceleración que provoca la temperatura sobre el desarrollo puede implicar un menor crecimiento neto del miotomo al final de un estadio de desarrollo dado.

2^a) La tasa de desarrollo muestra una sensibilidad frente a la temperatura muy elevada en el período embrionario, y disminuye progresivamente a lo largo de la etapa larvaria.

3^a) Tanto la temperatura de incubación como la de cultivo actúan sobre la dinámica de crecimiento muscular, modulando la contribución relativa de la hipertrofia e hiperplasia fibrilares a lo largo del período larvario. Como consecuencia de esto, la constitución fibrilar del miotomo (número y tamaño de

las fibras) muestra diferencias significativas en cada régimen de temperatura, aunque el crecimiento total del miotomo puede ser similar al final de un estadio de desarrollo dado.

4^a) Durante la fase vitelina la temperatura incrementa preferiblemente la hipertrofia fibrilar. La tasa hiperplásica experimenta una fuerte disminución durante el período prelarvario, no observándose influencia de la temperatura sobre este hecho. Con el inicio de la alimentación viva, comienza una etapa de rápido crecimiento en la que las altas temperaturas de cultivo aumentan la hipertrofia e hiperplasia fibrilares, pero fundamentalmente la hiperplasia, que adquiere un papel predominante durante esta etapa.

5^a) La dinámica de crecimiento de los lotes atlántico y mediterráneo de *D. labrax* mostró un comportamiento similar frente a la temperatura en las fases de rápido crecimiento (larvario y postlarvario). Sin embargo, al final de cada estadio de desarrollo se aprecian diferencias en la influencia de la temperatura sobre la hipertrofia y la hiperplasia fibrilares, observándose a la escamación una mayor sensibilidad de la hiperplasia en el lote atlántico que en el mediterráneo. Dado que proceden de reproductores genéticamente distintos, las diferencias descritas pueden ser atribuidas, al menos en parte, a este hecho.

6^a) La temperatura actúa de forma similar sobre los músculos blanco y rojo, aunque de forma más significativa sobre el músculo blanco, que es el principal músculo implicado en el crecimiento total del miotomo. Asimismo, la longitud y peso corporales describen un comportamiento semejante al que presenta el crecimiento del miotomo.

7^a) El incremento de la temperatura de incubación ejerce un ligero efecto positivo sobre el crecimiento muscular de *D. labrax* a lo largo del desarrollo larvario. Dicho efecto es gradual, manifestándose especialmente al final de la fase larvaria. Sin embargo, las altas temperaturas de cultivo actúan de forma más

inmediata, provocando un aumento significativo del crecimiento en poco tiempo. Las distintas combinaciones de temperatura de incubación y cultivo aplicadas, ponen de manifiesto un efecto de interacción entre ellas. Como consecuencia de dicha interacción, la influencia de la temperatura de incubación se manifiesta principalmente en los ejemplares que son cultivados posteriormente a temperatura ambiente.

8^a) El efecto de la temperatura de incubación sobre la capacidad de crecimiento larvario, unido a los buenos índices de supervivencia obtenidos a temperatura ambiente, mostraron la combinación de temperaturas 17 °C/ambiente como la más óptima para el cultivo larvario de *D. labrax* de este estudio.

VIII-BIBLIOGRAFÍA

VIII-BIBLIOGRAFÍA

- AKSTER, H.A. 1981. Ultrastructure of muscle fibres in head and axial muscles of the perch (*Perca fluviatilis*, L.). A quantitative study. Cell Tiss. Res., 219: 111-131.
- AKSTER, H.A. 1983. A comparative study of fibre type characteristics and terminal innervation in head and axial muscle of the carp (*Cyprinus carpio*, L.): A histochemical and electron-microscopical study. N. J. Zool., 33 (2): 164-188.
- AKSTER, H.A. and J.W.M. OSSE, 1978. Muscle fibre types in head muscles of the perch (*Perca fluviatilis*, L.), Teleostei: a histochemical and electromyographical study. N. J. Zool., 28 (1): 94-110.
- ALDERDICE, D.F. and C.R. FORRESTER, 1971. Effects of salinity and temperature on embryonic development of the petrale sole (*Eopsetta jordani*). J. Fish. Res. Bd Can., 28: 727-44.
- ALLIOT, E., A. PASTOUREAUD et H. THEBAULT, 1983. Influence de la temperature et de la salinite sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 31: 181-194.
- ANDERSEN, P., J.K.S. JANSEN and Y. LOINING, 1963. Slow and fast muscle fibres in the atlantic hag-fish (*Myxine glutinosa* L.). Acta Physiol. Scand., 57: 167-179.
- ASHBY, P.R., M. PINCON RAYMOND and A.J. HARRIS, 1993. Regulation of myogenesis in paralysed muscles in the mouse mutants peroneal muscular atrophy and muscular dysgenesis. Dev. Biol., 156: 529-36.
- ATKINSON, D., 1994. Temperature and organism size: a biological law for ectotherms. Advances in Ecological Research, 25: 1-58.

- ATKINSON, D., 1996. Ectotherm life-history responses to development temperature. In: (ed. I.A. Johnston and A.F. Bennett) Phenotypic and Evolutionary Adaptation of Organisms to Temperature. Society for Experimental Biology Seminar Series. Cambridge University Press. pp 183-204.
- AYALA, M.D., O., LÓPEZ-ALBORS, F. GIL, G. RAMÍREZ-ZARZOSA, E. ABELLÁN and F. MORENO, 1999. Red muscle development of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata*, (L.): Structural and ultrastructural morphometry. *Anat. Histol. Embryol.*, 28: 17-21.
- BALON, E.K., 1985. The theory of saltatory ontogeny and life history models revisited. In: (E.K. Balon Editor). *Early life History of Fishes*. Junk. Dordrecht, pp. 13-28.
- BANDMAN, E., R. MATSUDA and R.C. STROHMAN, 1982. Developmental appearance of myosin heavy and light chain isoforms *in vivo* and *in vitro* in chicken skeletal muscle. *Dev. Biol.*, 95: 508-18.
- BARENDTS, P.M.G. 1979. The relation between fiber composition and function in the jaw adductor muscle of the perch (*Perca fluviatilis* L.). A histochemical study. *Functional Anatomy. Proc. K. Neth. Akad. Wet. C.*, 82 (2): 147-162.
- BARNABÉ, G. 1976a. Contribution a la connaissance de la biologie du loup *Dicentrarchus labrax* (L.) (Poisson Serranidae). Université des Sciences et Technique du Languedoc. Montpellier, Station de Biologie Marine et Lagunaire, Site.
- BARNABÉ, G. 1991. La cría de lubina y dorada. *Acuicultura*. Ed. Omega. Barcelona. I.S.B.N: 84-282-0868-9. Cap. 4., vol II: 573-610.
- BARNABÉ, G. et R. BILLARD, 1983. Edition des Actes du Colloque L'aquaculture du bar (loup) et des Sparidés, Sète, 15, 16 et 17 mars.
- BARNARD, E.A., J.A. LYLES and J.A. PIZZEY 1982. Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy. *J. Physiol.*, 331: 333-354.
- BATTY, R.S. 1984. Development of swimming movements and musculature of larval herring (*Clupea harengus*). *J. Exp. Biol.*, 110: 217-179.
- BATTY, R.S., J.H.S. BLAXTER and K. FRETWELL, 1993. Effect of temperature on the escape responses of herring larvae, *Clupea harengus*, *Mar. Biol.*, 115: 523-528.
- BENFIELD P.A., S. LOWEY, D.D. LEBLANC and G.S. WALLER, 1983. Myosin isozymes in avian skeletal muscles. II. Fractionation of myosin isozymes from adult and embryonic chicken pectoralis muscle by immuno-affinity chromatography. *J. Muscle Res. Cell Mot.*, 4: 717-738.
- BLAXTER, J.H.S. 1969. Development: eggs and larvae. In: (eds W.S. Hoar and D.J. Randall) *Fish Physiology. Reproduction and growth*, New York and London: Academic Press, vol. 3: 177-252.

- BOKDAWALA, F.D. 1967. A histochemical study of fat in the red and white fibres of fish skeletal muscle. *J. Anim. Morphol. Physiol.*, 14: 231-241.
- BOKDAWALA, F.D. and J.C. GEORGE 1967. A quantitative study of fat, glycogen, lipase and succinic dehydrogenase in fish muscle. *J. Anim. Morphol. Physiol.*, 14: 223-230.
- BONE, Q. 1966. On the function of the two types of myotomal muscle fiber in Elasmobranch fish. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 46: 321.
- BONE, Q. 1978. Locomotor muscle. In: *Fish physiology*. (Edited by W.S. Hoar & D.G. Randall). Acad. Press. London: 361-424.
- BRETT, J.R., J.E. SHELBURN and C.T. SHOOP, 1969. Growth rate and body composition of fingerling sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in relation to temperature and ration size. *J. Fish Res. Bd Can.*, 26: 2363-94.
- BROOKS, S. and I.A. JOHNSTON, 1993: Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin subunit composition of myotomal muscle fibre types in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Mar. Biol.*, 117: 501-513.
- BUCKINGHAM, M. 1994. Molecular biology of muscle development. *Cell*, 78: 15-21.
- BULLER, A.J., J.C. ECCLES and R. ECCLES, 1960. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristics speeds of their responses. *J. Physiol.*, 150: 417-439.
- CALVO, J. and I.A. JOHNSTON, 1992. Influence of rearing temperature on the distribution of muscle fibre type in the turbot *Scophthalmus maximus* at metamorphosis. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 161: 45-55.
- CAMPION, D.R. 1984. The muscle satellite cell: A review. *International Review of Cytology*, 87: 225-251.
- CAMUS, P and C. KOUTSIKOPOULOS, 1984. Incubation expérimentale et développement embryonnaire de la daurade royale, *Sparus aurata* (L.), à différentes températures. *Aquaculture*, 42: 117-128.
- CARPENE, E. and A. VEGGETTI, 1981. Increase in muscle fibres in the lateralis muscle (white portion of Mugilidae) (Pisces, Teleostei). *Experientia*, 37: 191-193.
- CARPENE, E., A. VEGGETTI and F. MASCARELLO, 1982. Histochemical fibre types in the lateral muscle of fishes in fresh, brackish and salt water. *J. Fish. Biol.*, 20: 379-346.
- COVÈS, D., G. DEWAVRIN, G. BREUIL and N. DEVAUCELLE, 1991. Culture of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). In: (J. P. McVey Editor), *CRC Handbook of Mariculture. Finfish Aquaculture*. Boca Raton, USA., Vol. II: 3-20.

- CROCKETT E.L., B.D. SIDELL, 1990. Some pathways of energy metabolism are cold adapted in antarctic fishes. *Physiol. Zool.*, 63 (3): 472-488.
- CROCKFORD, T. and I.A JOHNSTON, 1993. Developmental changes in the composition of myofibrillar proteins in the swimming muscles of Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Marin Biol.*, 115: 15-22
- CROW, M.T. and F.E. STOCKDALE, 1986. The developmental programme of fast myosin heavy chain expression in avian skeletal muscles. *Dev. Biol.*, 118: 333-42.
- DEVOTO, S.H., E. MELANCON, J.S. EISEN and M. WESTERFIELD, 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*, 122: 3371-3380.
- DIVANACH, P. 1985. Contribution à la connaissance de la biologie et de l'élevage de six sparidés méditerranéés: *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (Poissons, Téléostéens). Unpubl. Thèse d'État. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 480pp.
- EGE, E. and A. KROGH, 1914. On the relation between the temperature and the respiratory exchange in fishes. *Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrog.*, 7: 48-55.
- EGGINTON, S. and B.D. SIDELL, 1989. Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 256:1-9.
- EKKER, M., J. WEGNER, M.A. AKIMENKO and M. WESTERFIELD, 1992. Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes. *Development*, 116: 1001-10.
- EL-FIKY, N. and W. WIESER, 1988. Life styles and patterns of development of gills and muscles in larval cyprinids (Cyprinidae; Teleostei). *J.Fish Biol.*, 33: 135-145.
- EL-FIKY, N., S. HINTERLEITNER and W. WIESER 1987. Differentiation of swimming muscles and gills, and development of anaerobic power in the larvae of cyprinid fish (Pisces, Teleostei). *Zoomorphol.*, 107: 126-132.
- ELLIOTT, J.M. 1979. The energetics of feeding, metabolism and growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to body weight, water temperature and ration size. *J. Anim. Ecol.*, 45: 923-48.
- ELLIOTT, J.M. 1982. The effects of temperature and ration size on the growth and energetics of salmonid in captivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B. (1): 81-91.
- ELLIOT, J.M. and L. PERSSON, 1978. The estimation of daily rates of food consumption for fish. *J. Anim. Ecol.*, 47: 977-91.
- FELDMAN, J.L. and F.E. STOCKDALE, 1992. Temporal appearance of satellite cells during myogenesis. *Devl Biol.*, 153: 217-226.

- FELSENFELD, A. L., M. CURRY, and C.B. KIMMEL, 1991. The *fab-I* mutation affecting myofibril structure in zebrafish muscle pioneer cells. *Devl Biol.*, 148: 23-30.
- FERRON, A. and W.C. LEGGETT, 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. In: (ed. J.H.S. Blaxter and A.J. Southward) *Advances in Marine Biology*. London: Academic Press, pp. 217-86
- FISHMAN, D.A. 1972. Development of striated muscle. In: (Edited by Bourne G.H.) *The Structure and Function of Muscle*. 2nd edition, 1: 75-148.
- FOCANT, B., F. HURIAUX, P. VANDEWALLE, M. CASTELLI and G. GOESSENS, 1992. Myosin, parvalbumin and myofibril expression in barbel (*Barbus barbus* L.) lateral white muscle during development. *Fish Physiol. Biochem.*, 10: 133-43.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. 1973. Membranous systems in muscle fibres. In: Bourne GH (ed) *The structure and function of muscle*. Academic Press, New York, II (2): 532-640.
- FRY, F.E.J. 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. In: (ed. W.S. Hoar and D.J. Randall). *Fish Physiology*. Academic Press. New York, Vol VI: 1-98.
- FUKUHARA, O., 1990. Effects of temperature on yolk utilization, initial growth, and behaviour of unfed marine fish-larvae. *Mar. Biol.*, 106: 169-174.
- GARCÍA-ALCÁZAR, A., M.D. AYALA, O. LÓPEZ-ALBORS, E. ABELLÁN, J. DELGADO, M.D. NORTES, M.J. NORTES, G. RAMÍREZ-ZARZOSA and F. GIL, 1999. Crecimiento y supervivencia larvarios en lubina atlántica y mediterránea sometida a diferentes regímenes de temperatura. Resúmenes VII Congreso Nacional de Acuicultura. Las Palmas de Gran Canaria. p. 48.
- GERLACH, G.F., L. TURAY, K.T. MALIC, J. LIDA, A. SCUTT and G. GOLDSPIK, 1990. Mechanisms of temperature acclimation in the carp: a molecular biology approach. *Am. J. Physiol.*, 259: 237-244.
- GIBSON, S. and I.A. JOHNSTON, 1995. Temperature and development in larvae of the turbot *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.*, 124: 17-25.
- GILL, H.S., A.H. WEATHERLEY and T. BHESANIA, 1982. Histochemical characterization of myotomal muscle in the bluntnose minnow, *Pimephales notatus* (Rafineske). *J. Fish Biol.*, 21: 205-214.
- GREER-WALKER, M. 1970. Growth and development of the skeletal muscle fibres of the cod (*Gadus morhua*, L.). *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 33: 228-244.
- GREER-WALKER, M. and G.A. PULL, 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.*, 7: 295-300.

- GREER-WALKER, M.G., A.C. BIRD, and G.A. PULL, 1972. The total number of white skeletal muscle fibre in cross section as a character for stock separation in North Sea herring (*Clupea harengus*). J. Cons. Int. Explor. Mer., 34: 238-243.
- GRIFFITHS, J.S. and D.F. ALDERDICE, 1972. Effects of acclimation and acute temperature experience on the swimming speed of juvenile coho salmon. J. Fish. Res. Bd Can., 29: 251-264.
- GUNNES, K. 1979. Survival and development of Atlantic salmon eggs and fry at three different temperatures. Aquaculture, 16: 211-218.
- GUTH, L. and H. YELLIN, 1971. The dynamic nature of the so-called "fiber types" of mammalian skeletal muscle. Exp. Neurol., 31: 277-300.
- HAMOR, T. and E.T. GARSIDE, 1976. Developmental rates of embryos of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in response to various levels of temperature, dissolved oxygen, and water exchange. Can J. Zool., 54: 1912-17.
- HAMOR, T. and E.T. GARSIDE, 1977. Size relations and yolk utilization in embryonated ova and alevins of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in various combinations of temperature and dissolved oxygen. Can. J. Zool., 55: 1892-8.
- HANKE, A.R., G.W. FRIARS, R.L. SAUNDERS and J.M. TERHUNE, 1989. Family-photoperiod interaction on growth in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. Genome, 32: 1105-1112.
- HATTA, K., R. BREMILLER, M. WESTERFIELD and C.B. KIMMEL, 1991. Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. Development, 112: 821-832.
- HAYES, F.R., D. PELLUET, E. GORHAM, 1953. Some effects of temperature on the embryonic development of the salmon (*Salmo salar*). Can J. Zool, 31:42-51.
- HERBINGER, C.M. and G.F. NEWKIRK, 1990. Sources of family variability for maturation incidence in cultivated Atlantic salmon. Aquaculture, 85: 153-162.
- HIGGINS, P.J. 1990. The histochemistry of muscle in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Fish Biol., 37: 521-9.
- HIGGINS, P.J. and J.E. THORPE, 1990. Hyperplasia and hypertrophy in the growth of skeletal muscle in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). J. Fish Biol., 37: 505-519.
- HINTERLEITNER, S., J. THURNER-FLÜR, W. WIESER and N. EL-FIKY, 1989. Profiles of enzyme activity in larvae of two cyprinid species with contrasting life styles (Cyprinid, Teleostei). J. Fish Biol., 35: 709-718.
- HOH, J.F.Y. 1991. Myogenic regulation of mammalian skeletal muscle fibres. News Physiol. Sci., 6:1-6.

- HOH, J.F. and S. HUGHES, 1988. Myogenic and neurogenic regulation of myosin gene expression in cat jaw-closing muscles regenerating in fast and slow limb muscle beds. *J. Muscle Res. Cell Motil*, 9: 59-72.
- HOLZER, H. 1970. Myogenesis. In: (Edited by Schjeide O.A. and Vellis J.) *Cell differentiation*. Princeton, New Jersey.
- HOULIHAN D.F. and P. LAUREN, 1987. Effects of exercise training on the performance, growth, and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 1614-1621.
- HUDSON, R.C.L., 1973. On the function of the white muscles in teleosts at intermediate swimming speeds. *J. Exp. Biol.*, 58: 504-522.
- HUGHES, S.M. and H.M. BLAU, 1992. Muscle fiber pattern is independent of cell lineage in postnatal rodent development. *Cell*, 68: 659-71.
- HUGHES, S.M., M. CHO, L. KARSCH-MIZRACHI, M. TRAVIS, L. SILBERSTEIN, L. LEINWAND and H. BLAU, 1993. Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian skeletal muscle. *Dev. Biol.*, 158: 183-99.
- HUMPESCH, U. 1985. Inter- and intra-specific variation in hatching success and embryonic development of five species of salmonids and *Thymallus thymallus*. *Arch. Hydrobiol.*, 104: 129-44.
- HUNT VON HERBING, I., R. G. BOUTILIER, T. MIYAKE and B. K. HALL, 1996. Effects of temperature on morphological landmarks critical to growth and survival in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.*, 124: 593-606.
- HUNTER, J.R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. In: (R. Lasker Editor). *Marine Fish Larvae*. Washington Sea Grant. Seattle, WA. pp. 33-77.
- IBABE, I. 1997. Estudio histoquímico y morfométrico de la musculatura lateral de diferentes especies de peces teleosteos marinos del Sureste Español. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- IRVIN, D.N. 1974. Temperature tolerance of early development stages of Dover sole, *Solea solea* (L.). In: (J.H.S. Blaxter Editor). *The Early Live History of Fish*. Springer, Berlin, pp. 449-463.
- JOHNSON, M.S. 1971. Adaptive lactate dehydrogenase variation in the crested blenny, *Anoplarchus*. *Heredity*, 27: 205-211.
- JOHNSON, M.S. 1977. Association of allozymes and temperature in the crested blenny, *Anoplarchus purpurenscens*. *Mar. Biol.*, 41: 147-153.
- JOHNSTON, I.A. 1979. Calcium regulatory proteins and temperature acclimation of actomyosin from a eurythermal teleost (*Carassius auratus*, L.). *J. Comp. Physiol.*, 129: 163-167.

- JOHNSTON, I.A. 1980. Specialisations of fish muscle. In: (Ed. D.F. Goldspink) Development and Specialisations Muscle Soc. Exp. Biol. Sem. Ser., 7: 123-148.
- JOHNSTON, I.A. 1982. Physiology of muscle in hatchery raised fish. Comp. Biochem. Physiol., 73B: 105-124.
- JOHNSTON, I.A. 1989. Antarctic fish muscles - structure, function and physiology. Antarct. Sci., 1: 97-108.
- JOHNSTON, I.A. 1993: Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae. Mar. Biol., 116: 363-379.
- JOHNSTON, I.A. 1994. Development and plasticity of fish muscle with growth. Bas. Appl. Myol., 4: 253-68.
- JOHNSTON, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. Aquaculture, 177: 99-115.
- JOHNSTON, I.A. and M. LUCKING, 1978. Temperature induced variation in the distribution of different types of muscle fibre in the goldfish (*Carassius auratus* L.). J. Comp. Physiol., 124: 111-116.
- JOHNSTON, I.A. and B. MAITLAND, 1980. Temperature acclimation in crucian carp, *Carassius carassius* L., morphometric analysis of muscle fibre ultrastructure. Fish Biol., 17: 113-25.
- JOHNSTON, I.A. and T.W. MOON, 1981. Fine structure and metabolism of multiply innervated fast muscle fibres in teleost fish. Cell Tissue Res., 219: 93-109.
- JOHNSTON, I.A., and Z. HORNE, 1994. Immunocytochemical investigations of muscle differentiation in the Atlantic herring (*Clupea harengus*: Teleostei). J. Mar. Biol. Ass. U.K., 74: 79-91.
- JOHNSTON, I.A. and H.A. MCLAY, 1997. Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Can. J. Zool., 75: 64-74.
- JOHNSTON, I.A., N. FREARSON and G. GOLDSPIK, 1972. Myofibrillar ATPase activities of the white and red muscles of marine fish. Experientia, 28: 713-714.
- JOHNSTON, I.A., S. PATTERSON, P.S. WARD and G. GOLDSPIK, 1974. The histochemical demonstration of myofibrillar adenosine triphosphatase activity in fish muscle. Can. J. Zool., 52: 871-877.
- JOHNSTON, I.A., P.S. WARD and G. GOLDSPIK, 1975. Studies on the swimming musculature of the rainbow trout. I. Fibre types. J. Fish Biol., 7: 451-458.
- JOHNSTON, I.A., W. DAVISON and G. GOLDSPIK, 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. J. Comp. Physiol., 114: 203-216.

- JOHNSTON, I.A., V.L.A. VIEIRA and M. ABERCROMBY, 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring *Clupea harengus*. J. Exp. Biol., 198: 1389-1403.
- JOHNSTON, I.A., V.L.A. VIEIRA and J. HILL, 1996. Temperature and ontogeny in ectotherms: muscle phenotype in fish. In: (Ed. I.A. Johnston and A.F. Bennett) Phenotypic and Evolutionary Adaptation of Organisms to Temperature. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser: Cambridge University Press. pp. 153-181
- JOHNSTON, I.A., N.J. COLE, V.L.A. VIEIRA and I. DAVIDSON, 1997. Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. J. Exp. Biol., 200: 849-868.
- JOHNSTON, I.A., N.J. COLE, M. ABERCROMBY and V.L. VIEIRA, 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. J. Exp. Biol., 201: 623-646.
- JONES, P.L. and B.D. SIDELL, 1982. Metabolic responses of Striped Bass (*Morone saxatilis*) to temperature acclimation. II. Alterations in metabolic carbon sources and distributions of fiber types in locomotory muscle. J. Exp. Biol., 219: 163-171.
- KAMLER, E. 1992: Early life history of fish: an energetics approach. Eds. Chapman and Hall, London.
- KAMLER, E., M. SZLAMINSKA, M. KUCZYNSKI, J. HAMÁKOVÁ, J. KOURIL and R. DABROWSKI, 1994. Temperature-induced changes of early development and yolk utilisation in the African catfish *Clarias gariepinus*. J. Fish Biol., 44: 311-326.
- KAZAKOV, R.V. 1981. The effect of the size of Atlantic salmon, *Salmo salar*, L., eggs on embryos and alevins. J. Fish Biol., 19:353-360.
- KILARSKI, W. 1967. The fine structure of striated muscles in teleost. Z. Mikr. Anat., 79: 562-580.
- KILARSKI, W. and M. KOZLOWSKA, 1979. Myofibrillogenesis of the lateral musculature in the trout (*Salmo trutta* L.). Develop. Growth Differ., 21: 349-360.
- KILARSKI, W. and M. KOZLOWSKA, 1983. Ultrastructural characteristic of the teleostean muscle fibers and their nerve endings. The Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). Z. mikrosk.-Anat. Forsch., 97: 1022-1036.
- KILARSKI, W. and M. KOZLOWSKA, 1985. Histochemical and electromicroscopical analysis of muscle fiber in myotomes of teleost fish (*Noemacheilus barbatus*, L.). Gegenbaurs Morph. Jahtb., 1 (8): 55-72.
- KILARSKI, W. and M. KOZLOWSKA, 1987. Comparison of ultrastructural and morphometrical analysis of tonic, white and red muscle fibers in the myotome of teleost fish (*Noemacheilus barbatus*, L.). Z. Mikr. Anat., 101 (4): 636-648.

- KILARSKI, W., M. KOZLOWSKA and M.G. MARTYNOVA, 1992. The ultrastructure of myotomal muscles of the golomianka, *Comephorus baikalensis*, Pallas. *J. of Fish Biol.*, 40: 489-495.
- KIRAN, S. and C.L. TALESARA, 1985. Identification of the muscle fibre types in the freshwater teleost fish, *Mastacembelus pancalus* (Hamilton): Histochemical and biochemical observations. *Proc. Indian Anat. Sci. Acad.*, B51 (3): 319-325.
- KOBIYAMA, A., Y. NIHEI, Y. HIRAYAMA, K. KIKUCHI, H. SUETAKE, I.A. JOHNSTON and S. WATABE, 1998. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and Mef2 families of muscle transcription factors in the carp. *J. Exp. Biol.*, 201: 2801-2813
- KOHEN, R.K. and D.I. RASMUSSEN, 1967. Polymorphic and monomorphic serum esterase heterogeneity in catostomid fish populations. *Biochem. Genet.*, 1: 131-139.
- KORNELIUSSEN, H., H.A. DAHL and J.E. PAULSEN, 1978. Histochemical definition of muscle fibre types in the trunk musculature of a teleost fish (Cod, *Gadus morhua*, L.). *Histochem.*, 55: 1-16.
- KOUMANS, J.T.M., H.A. AKSTER, G.J. DULOS and J.M. OSSE, 1990. Myosatellite cells of *Cyprinus carpio* (Teleostei) in vitro: isolation, recognition and differentiation. *Cell Tissue Res.*, 261: 173-181.
- KOUMANS, J.T.M., H.A. AKSTER, G.H.R. BOOMS, C.J.J. LEMMENS and J.W.M. OSSE, 1991. Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). *Am. J. Anat.*, 192: 418-24.
- KOUMANS, J.T.M., H.A. AKSTER, G.H.R. BOOMS and J.W.M. OSSE, 1993a. Influence of fish size on proliferation and differentiation of culture myosatellite cells of white axial muscle of carp (*Cyprinus carpio*). *Differentiation*, 53: 1-6.
- KOUMANS, J.T.M., H.A. AKSTER, G.H.R. BOOMS and J.W.M. OSSE, 1993b. Growth of carp (*Cyprinus carpio*) white axial muscle; hyperplasia and hypertrophy in relation to the myonucleus/sarcoplasm ratio and the occurrence of different subclasses of myogenic cells. *J. Fish Biol.*, 43: 69-80.
- KOUMANS, J.T.M., H.A., AKSTER, A. WITKAM and J.W.M. OSSE, 1994. Numbers of myonuclei and of myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Fish Biol.*, 44: 391-408.
- KOUMANS, J.T.M. and H.A. AKSTER, 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110A (1): 3-20.
- LASKER, R., H.M. FEDER, G.H. THEILACKER and R.C. MAY, 1970. Feeding, growth and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. *Mar. Biol.*, 5: 345-53.

- LINDSEY, C.C. and A.N. ARNASON, 1981. A model for responses of vertebral numbers in fish to environmental influences during development. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 334-47.
- 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., F. GIL, G. RAMÍREZ ZARZOSA, J. M. VÁZQUEZ, R. LATORRE, A. GARCÍA ALCÁZAR, A. ARENCIBIA and F. MORENO, 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.
- LOWEY, S., P.A. BENFIELD, D.D. Le BLANC and G.S. WALLER, 1983. Myosin isozymes in avian skeletal muscles. I. Sequential expression of myosin isozymes in developing chicken pectoralis muscles. *J. Muscle Res. Cell Mot.*, 4: 695-716.
- LUFT, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 409.
- MALESSA, P. 1969. Temperature adaptation of the eel (*Anguilla vulgaris*). III. Intensity and distribution of the activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase in the lateral muscle of juvenile and adult animals. *Mar. Biol.*, 3: 143-158.
- MARTÍNEZ, I., J.S. CHRISTIANSEN, R. OFSTAD and R.L. OLSEN, 1991. Comparison of myosin isoenzymes present in skeletal and cardiac muscles of the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*, L.). *Europ. J. Bioch.*, 195: 743-753.
- MASCARELLO, F., M.G. ROMANELLO and P.A. SCAPOLO, 1984. Histochemical and immunohistochemical profile of pink muscle fibres in some teleosts. *Histochem.*, 84: 251-255.
- MASCARELLO, F., M.G. ROMANELLO and P.A. SCAPOLO, 1986. Histochemical and immunohistochemical profile of pink muscle fibres in some teleosts. *Histochem.*, 84: 251-255.
- MASCARELLO, F., A. ROWLERSON, G. RADAELLI, P.A. SCAPOLO, A. VEGGETTI, 1995. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* L: I. Myosin expression and organization of fibre types in lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle res. Cell motil.*, 16: 213-222.
- MATSCHAK, T.W. and N.C. STICKLAND, 1995. The growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) myosatellite cells in culture at two different temperatures. *Experientia*, 51: 260-266.
- MATSUOKA M. 1984. Morphometry of the myotomal muscle fibres in larvae and juveniles of the red sea bream. *Bull. Japanese Soc. Scient. Fisheries.*, 50 (11): 1811-1816.

- MATSUOKA, M. and T. IWAI, 1984. Development of the Myotomal Musculature in the Red Sea Bream. Bull. Japanese Soc. Scient. Fisheries., 50 (1): 29-35.
- MAURO, A. 1961. Satellite cells of skeletal muscle fibres. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 459-462.
- MILLER, J.B., E.A. EVERITT, T.H. SMITH, N.E. BLOCK and J.A. DOMINOV, 1993. Cellular and molecular diversity in skeletal muscle development: news from *in vitro* and *in vivo*. BioEssays, 15: 191-6.
- MOKSNESS, E., G. ROSEN LUND and O. LIE, 1995. Effect of fish meal quality on growth of juvenile wolfish, *Anarhichas lupus* L. Aquaculture Res., 26: 109-115.
- MOLKENTIN, J.D., E.N. OLSON, 1996. Defining the regulatory networks for muscle development. Curr. Opin. Genet. Dev., 6: 445-453.
- MOSSE, P.R.L. 1979. Capillary distribution and metabolic histochemistry of the lateral propulsive musculature of the pelagic teleost fish. Cell Tissue Res., 203: 141-160.
- MOSSE, P.R.L. and T.C.L. HUDSON, 1977. The functional roles of different muscle fiber types identified in the myotomes of marine teleost: a behavioural, anatomical and histochemical study. J. Fish Biol., 11: 417-430.
- MUNSTERBERG, A.E., J. KITAJEWSKI, D.A. BUMCROT, A.P. MCMAHON and A.B. LASSAR, 1995. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. Genes Dev., 9: 2911-22.
- NAG, A.C. 1972. Ultrastructure and adenosine triphosphatase activity of red and white muscle fibers of the caudal region of a fish, *Salmo gairdneri*. J. Cell Biol., 55: 42-57.
- NAG, A.C. and J.R. NURSALL, 1972. Histogenesis of white and red muscle fibres of trunk muscles of fish, *Salmo gairdneri*. Cytobios., 6: 227-246.
- NARUSAWA, M., T.B. FITZSIMONS, S. IZUMO, B. NADAL-GINARD, N.A. RUBINSTEIN and A.M. KELLY, 1987. Slow myosin in developing rat skeletal muscle. J. Cell Biol., 104: 447-59.
- NATHANAILIDES, C., O. LÓPEZ ALBORS and N.C. STICKLAND, 1995a. Influence of prehatch temperature on the development of muscle cellularity in posthatch Atlantic-Salmon (*Salmo salar*, L.) Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52 (4): 675-680.
- NATHANAILIDES, C., O. LÓPEZ ALBORS and N.C. STICKLAND, 1995b. temperature- and developmentally-induced variation in the histochemical profile of myofibrillar ATPase activity in carp. J. Fish Biol., 47: 631-640.
- NATHANAILIDES, C., O. LÓPEZ ALBORS, E. ABELLÁN, J.M. VÁZQUEZ, D.D. TYLER, A. ROWLERSON, N.C. STICKLAND, 1996. Muscle cellularity in

- relation to somatic growth in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*, (L.) Aquaculture Res., 27: 885-889.
- O'CONNEL, C.P. 1981. Development of organ system in the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other teleost. Am. Zool., 21: 429-446.
- OGATA, T. 1958a. A histochemical study of the red and white muscle fibres. Part I. Activity of the succino-oxidase system in muscle fibres. Acta Med. Okyjama, 12: 216-227.
- OGATA, T. 1958b. A histochemical study of the red and white muscle fibres. Part II. Activity of the cytochrome oxidase in muscle fibres. Acta Med. Okyjama, 14: 228-232.
- OLSEN, E.N. and W.H. KLEIN, 1994. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. Genes Dev, 8: 1-8.
- OLSON, E. 1992. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. Dev. Biol., 154: 261-272.
- ONTELL, M. 1974. Muscle satellite cell: a validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation. Anat. Rec., 178: 211-228.
- ONTELL, M. 1977. Neonatal muscle: an electron microscopic study. Anat. Rec., 189: 669-690.
- ONTELL, M. and K. KOZEKA, 1984. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. Am. J. Anat., 171: 133-48.
- PAGE, S., J.B. MILLER, J.X. DIMARIO, E.J. HAGER, A. MOSSER and F.E. STOCKDALE, 1992. Developmentally regulated expression of three slow isoforms of myosin heavy chain: diversity among the first fibres to form in avian muscle. Dev. Biol., 154: 118-28.
- PATRUNO, M., G. RADAELLI, F. MASCARELLO and M.D.C. CARNEVALI, 1998. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. Anat. Embryol., 198: 487-504.
- PATTERSON, S. and G. GOLDSPINK, 1976. Mechanisms of myofibril growth and proliferation in fish muscle. J. Cell Sci., 22: 607-616.
- PATTERSON, S., I.A. JOHNSTON and G. GOLDSPINK, 1975. A histochemical study of the lateral muscles of five teleost species. J. Fish Biol., 7: 159-166.
- PETERSON, R.H., H.C.E. SPINNEY and A. SREEDHARAN, 1977. Development of Atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs and alevins under varied temperature regimes. J. Fish. Res. Board Can., 43: 31-43.

- PETTE, D. and G. VRBOVÁ, 1985. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fiber. *Muscle nerve*, 8: 676-689.
- PICKET, G.D. and M.G. PAWSON, 1994. Sea bass. Eds. Chapman and Hall, London.
- PIEROBON BORMIOLI, S., S. SARTORE, L. DALLA LIBERA, M. VITADELLO and S. SCHIAFFINO, 1980. "Fast" isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 1179-1118.
- PIPE, R.K. and P. WALKER, 1987. The effect of temperature on development and hatching of scad. *Trachurus trachurus* L. eggs. *J. Fish Biol.*, 31: 675-682.
- POLO, A., M. YUFERA, and E. PASCUAL, 1991: Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata*, L. *Aquaculture*, 92: 367-375.
- POURQUIÉ, O., C.M. FAN, M. COLTEY, E. HIRSINGER, Y. WATANABE, C. BRÉANT, P. FRANCIS WEST, P. BRICKELL, M. TESSIER-LAVIGNE and N.M. DOUARIN, 1996. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell.*, 84: 461-71.
- POWELL, R.L., M.V. DODSON and J.G. CLOUD, 1989. Cultivation and differentiation of satellite cells from skeletal muscle of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.*, 250: 333-338.
- POWERS, D.A. and D. POWERS, 1975. Predicting gene frequencies in natural populations: A testable hypothesis. In: (Edit MARKERT C.) *The Isozymes*. Academic Press, New York., Vol IV, pp. 63-84
- PROCTOR, C., P.R.L. MOSSE and R.C.L. HUDSON, 1980. A histochemical and ultrastructural study of the development of the propulsive musculature of the brown trout, *Salmo trutta*, L., in relation to its swimming behaviour. *J. Fish Biol.*, 16: 309-329.
- RAINER, M.D. and M.J. KRENAN, 1967. Role of the red and white muscles in the swimming of the skipjack tuna. *Nature*, 214: 392-393.
- RAMÍREZ ZARZOSA, G. 1992. Estudio de la musculatura lateral de la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.) y de la dorada (*Sparus aurata*, L.) durante el desarrollo larvario y postlarvario. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- RAMÍREZ ZARZOSA, G., F. GIL, F. MORENO, J.M. VÁZQUEZ y R. LATORRE, 1991. Estudio histoquímico de las fibras musculares de algunos teleósteos marinos y de agua dulce. *Anat. Histol. Embryol.*, 20: 169-179.
- RAMÍREZ ZARZOSA, G., F. GIL, R. LATORRE, A. ORTEGA, A. GARCÍA ALCÁZAR, E. ABELLÁN, J.M. VÁZQUEZ, O. LÓPEZ ALBORS, A. ARENCIBIA and F. MORENO, 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., F. GIL, J.M. VÁZQUEZ, A. ARENCIBIA, R. LATORRE, O. LÓPEZ ALBORS, A. ORTEGA and F. MORENO, 1998. The post-larval development of lateral musculature in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) and sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) *Anat. Histol. Embryol.*, 27: 21-29.
- ROJO, A.L., 1988. Diccionario enciclopédico de anatomía de peces. Monografía Inst. Esp. Oceanogr. nº 3. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- ROMANELLO, M.G., P.A. SCAPOLO, M.L. FICOVAVANTI and A. VEGGETTI, 1986. Diferenziazione delle miosine e organizzazione del muscolo laterale di *Dicentrarchus labrax* (L.) *Citti. Soc. It. Sc. Vet.*, 40: 120-122.
- ROMANELLO, M.G., P.A. SCAPOLO, S. LUPRANO, S. and F. MASCARELLO, 1987. Post-larval growth in the lateral white muscle of the eel, *Anguilla anguilla*. *J. Fish. Biol.*, 30: 161-172.
- ROMBOUGH, P.J. 1988. Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life. In: (ed. W.S. Hoar and D.J. Randall) *Fish Physiology*. San Diego: Academic Press. Vol XI, Part A, pp. 59-161.
- ROWLERSON, A. 1994. An outline of fibre types in vertebrate skeletal muscle: histochemical identification and myosin isoforms. *Bas. Appl. Myol.*, 4: 333-52.
- ROWLERSON, A., P.A. SCAPOLO, F. MASCARELLO, E. CARPENE and A. VEGGETTI, 1985. Comparative study of myosin present in the lateral muscle of some fish: species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 6: 601-640.
- ROWLERSON, A., A. MASCARELLO, G. RADAELLI and A. VEGGETTI, 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.
- RUDNICKI, M.A. and R. JAENISCH, 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays*, 17: 203-209.
- RUSSEL, S.D., N.A. CAMBON and R.G. WHALEN, 1993. Two types of neonatal-to-adult fast myosin heavy chain transitions in rat hindlimb muscle fibres. *Dev. Biol.*, 157: 359-70.
- SÄNGER, A. 1991. Axial muscle of Cyprinids - Muscle Fibre types and Adaptational Changes with a literature survey on this problem in fishes generally. Habilitation, Salzburg.
- SÄNGER, A., H. CLAASSEN and H. ADAM, 1988: The arrangement of muscle fiber types in the axial muscle of various cyprinids (Teleostei). *Zool. Anz.*, 221: 44-49.
- SÄNGER, A., G. GOLDSCHMID and H. ADAM, 1989. Muscle fiber type distribution of various cyprinids. *Prog. Zool.*, 35: 561-563.

- SÄNGER, A., S.X. KIM and S. ADAM, 1990. The fine structure of muscle fibres of roach, *Rutilus rutilus* (L.) and chub *Leuciscus cephalus* (L.), Cyprinidae, Teleostei: interspecific differences and effects of habitat and season. *J. Fish. Biol.*, 36: 205-213.
- SANTULLI, A., A. MODICA, L. CUSENZA, A. CURATOLO and V. D'AMELIO, 1993. Effects of temperature on gastric evacuation rate and absorption and transport of dietary lipids in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol 105A (2): 363-367.
- SARTORE, S., L. GORZA, and S. SCHIAFFINO, 1982. Fetal myosin heavy chains regenerating muscle. *Nature.*, 298: 294-296.
- SCAPOLO, P.A. and A. ROWLERSON, 1987. Pink lateral muscle in carp (*Cyprinus carpio*, L.): histochemical properties and myosin composition. *Experientia*, 43: 384-386.
- SCAPOLO, P.A., A. VEGGETTI, A. ROWLERSON, F. MASCARELLO and E. CARPENE, 1984. Do the small new fibres of grey mullet white muscle arise by fibre splitting?. *J. Muscle Res. Cell Mot.*, 5: 214.
- SCAPOLO, P.A., M.G. ROMANELLO, A. VEGGETTI and F. MASCARELLO, 1987. Modalità di accrescimento larvale e port larvale nei teleostei, Ricerche ultrastrutturali e morfometriche sul muscolo laterale di *Dicentrarchus labrax* (L.) *Abstr. Cong. Soc. It. Anat.*, 42: 311.
- SCAPOLO, P.A., A. VEGGETTI, F. MASCARELLO and M.G. ROMANELLO, 1988. Developmental transitions of myosin isoforms and organisation of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embryol.*, 178: 287-295.
- SCHNEIDER, S.M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 35-68.
- SHAKLEE, J.B., J.A. CHRISTIANSEN, B.P. SIDELL, C.C. PROSSER and G.S. WHITT, 1977. Molecular aspects of temperature acclimation in fish. Contributions of changes in enzymic activities and isoenzyme pattern to metabolic reorganisation in the green sunfish. *J. Exp. Zool.*, 201: 1-20.
- SHINDO, K., T. TSUCHIYA and J.J. MATSUMOTO, 1986. Histological study on white and dark muscles of various fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52 (8): 1377-1399.
- SHULTZ, E. 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev. Biol.*, 175: 84-94.
- SIDELL, B.D. 1980. Responses of goldfish (*Carassius auratus* L.) muscle to acclimation temperature: alterations in biochemistry and proportions of different fibres types. *Physiol. Zool.*, 53: 98-107.
- SIDELL, B.D. 1983. Cellular acclimatization to environmental change by quantitative alterations in enzymes and organelles. In: (ed. A.R. Cossins y P. Sheterline)

- Cellular Acclimatización to Environmental Change. Cambridge, New York: Cambridge University Press. Soc. Exp. Bio. Seminar Ser., 17: 103-120.
- SILVA DE, C.D. 1974. Development of respiratory system in herring and plaice larvae. In: (Ed. Blaxter, J.H.S.) The early life history of fish. Springer Verlag, Berlin, p. 465-485.
- SLINDE, E. and H. KRIVI, 1980. Studies on the nature of the Z-discs in skeletal muscle fibres of sharks, *Etmopterus spinax* L. and *Galeus melastomus* Rafinesque-Schamaltz. J. Fish Biol., 16: 299-308.
- SMITH, H., J.M. AMELINK-KOUTSTALL, J. VIJVERBERG and J.C. VON VAUPEL-KLEIN, 1971. Oxygen consumption and efficiency of swimming goldfish. Comp. Biochem. Physiol., 39A: 1-28.
- SMITH, H., R.J. VAN DEN BERG and I. KIJN-DEN HARTOG, 1974. Some experiments on thermal acclimation in the goldfish (*Carassius auratus* L.) Neth J. Zool., 32-49.
- STICKLAND, N.C. 1983. Growth and development of the muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Anat., 137 (2): 323-33.
- STICKLAND, N.C., R.N. WHITE, P.E. MESCALL, A.R. CROOK, and J.E. THORPE, 1988. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). Anat. Embryol., 178: 253-257.
- STOCKDALE, F.E. 1992. Myogenic cell lineages. Dev. Biol., 154: 284-98.
- STOCKDALE, F.E. and J.B. MILLER, 1987. The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscle. Dev. Biol., 123:1-9.
- STOIBER, W, A.M. SÄNGER, 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibres in teleost fish. Anat. Embryol., 194: 569-579.
- TAKAHAMA, H., V. MIZUHIRA, F. SASAKI and K. WATANAKE, 1984. Satellite cells in the tail muscles of the urodelean larvae during development Cell Tissue Res., 236: 431-438.
- TALESARA, C.L. and A.J. URFI, 1987. A histophysiological study of muscle differentiation and growth in the common carp, *Cyprinus carpio*. Var. communis. J. Fish Biol., 31: 45-54.
- TANNING, A.V. 1952: Experimental study of meristic characters in fishes. Biol. Rev., 27: 169-193.
- TATARCZUCH, L. and W. KILARSKI, 1982. Histochemical analysis of muscle fibers in myotome of teleost fishes (*Carassius auratus*, Gibelio). Folia Histochem. Cytochem., 20 (3-4): 143-170.

- Te KRONNIE, G., Y. DONSELAAR, T. SOUKUP and W. VAN RAAMSDONK, 1981. Immunohistochemical differences in myosin composition among intrafusal muscle fibres, *Histochemistry*, 73: 65-74.
- Te KRONNIE, G., L. TATARCZUCH, W. VAN RAAMSDONK and W. KILARSKI, 1983. Muscle fibre types in the miotome of stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L.; a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *J. Fish Biol.*, 22: 303-316.
- THORPE, J.E. and R.I.G. MORGAN, 1978. Parental influence on growth rate, smolting rate and survival in hatchery reared juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Biol.*, 13: 549-556.
- THORPE, J.E., M.S. MILES and D.S. KEAY, 1984. Developmental rate, fecundity and egg size in Atlantic salmon, *Salmo salar*, L. *Aquaculture*, 43: 289-305.
- USHER, M.L., N.C. STICKLAND and J.E. THORPE, 1994: Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. *J. Fish Biol.*, 44: 953-964.
- Van RAAMSDONK, W., A. Van Der STELT, P.C. DIEGENBACH, W. Van Der BERG, H. De BERYN, J. Van DIJK and P. MIJZEN, 1974. Differentiation of the musculature of the teleost *Brachydanio rerio*. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, 145: 321-342.
- Van RAAMSDONK, W., C.W. POOL and G. Te KRONNIE, G., 1978. Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Z. Anat. Embryol.*, 153: 137-155.
- Van RAAMSDONK, W., G. Te KRONNIE, C.W. POOL and W. Van De LAARSE, 1980. An immune histochemical and enzymic characterization of the muscle fibres in myotomal muscle of the teleost *Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan. *Acta Histochem.*, 67: 200-216.
- Van RAAMSDONK, W., L. Van't VEER, K. VEEKEN, C. HEYTING, C.W. POOL, 1982. Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*, the zebrafish: posthatching development. *Anat. Embryol.*, 164: 51-62.
- Van RAAMSDONK W., W. MOS, G. TE KRONNIE, C.W. POOL and P. MIJZEN, 1990. Differentiation of the musculature of the teleost *Brachydanio rerio*. II. Effects of immobilization on the shape and structure of the somites. *Acta Morphol. Neerl. Scand.*, 17: 259-274.
- VEGGETTI, A., F. MASCARELLO, P.A. SCAPOLO and A. ROWLERSON, 1990. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.): An ultrastructural and morfometric study. *Anat. Embryol.*, 182: 1-10.
- VEGGETTI, A., F. MASCARELLO, P.A. SCAPOLO, A. ROWLERSON and M.D.C. CARNEVALI, 1993. Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish *Poecilia reticulata* (Peters) (Atheriniformes,

- Poeciliidae): a histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embriol.*, 187: 353-361.
- VIEIRA, V.L.A., I.A. JOHNSTON, 1992. Influence of temperature on muscle-fibre development in larvae of the herring *Clupea harengus*. *Mar. Biol.*, 112: 333-341.
- WALESBY, N.J. and I.A. JOHNSTON, 1980. Fibre types in the locomotory muscles of an antarctic teleost, *Notothenia rossii*: A histochemical ultrastructural and biochemical study. *Cell Tissue Res.*, 208: 143-164.
- WANSON, J.C. and P. DROCHMAN, 1968. Epoxi technique inclusion for electron microscopy. *Cell Biol.*, 38: 130.
- 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 H.S. GILL, 1981. Characteristics of mosaic muscle growth in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Experientia*, 37: 1102-3.
- WEATHERLEY, A.H. and H.S. GILL, 1982. Influence of bovine growth hormone on the growth dynamics of mosaic muscle in relation to somatic growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *J. Fish Biol.*, 20: 165-172.
- WEATHERLEY, A.H. and H.S. GILL, 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia*, 41: 353-4.
- WEATHERLEY, A.H. and H.S. GILL, 1987. *The Biology of fish growth*. London: Academic press, 443pp.
- WEATHERLEY, A.H., H.S. GILL and S.C. ROGERS, 1979. Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.*, 57: 2385-92.
- WEATHERLEY, A.H., H.S. GILL and S.C. ROGERS, 1980. The relationship between mosaic muscle fibres and size in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, 17: 603-10.
- WEATHERLEY, A.H., H.S. GILL and A.F. LOBO, 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.
- WEBB, P. 1970. Some aspects of the energetics of swimming of fish with special reference to the cruising performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). Ph.D. Thesis. Univ. Bristol.
- WEYDERT, A. 1988. Myogenesis and gene expression. *Bull. Inst. Pasteur*, 86: 159-210.
- WHALEN, R.G., S.M. SELL, G.S. BUTLER-BROWNE, K. SCHWARZ, P. BOUVERET and I. PINSET-HARSTROM, 1981. Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, 292: 805-809.

- WILD, V., H. SIMIANER, H.M. GJOEN and B. GJERDE, 1994. Genetic parameters and genotype-environment interaction for early sexual maturity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 128: 51-65.
- WILLEMSE, J.J. and P.G. Van Der BERG, 1978. Growth of striated muscle fibres in the M. lateralis of the european eel *Anguilla anguilla* (L.) (Pisces, Teleostei). *J. Anat.*, 125 (3): 447-460.
- WILLEMSE, J.J. and A. De RUTTER, 1979. A quantitative identification of four types of fibers in the lateral musculature of immature european eel (*Anguilla anguilla*, L.). *Pisces, Teleostei. Aquaculture*, 17: 105-111.
- WILLEMSE, J.J. and C. LIEUWMA-NOORDANUS, 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.
- ZAWADOWSKA, B. and W. KILARSKI, 1983. Muscle fibre composition of the eye muscles of the carp (*Cyprinus carpio*, L.) defined on the base of histochemical observations. *Folia Histochem. Cytochem.*, 21: 115-126.
- ZAWADOWSKA, B. and L. TATARCZUCH, 1990. Acid princubation in histochemical classification of fish muscle fibers. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 104: 449-457.

IX. ANEXO

IX-ANEXO: TABLAS DE DATOS.

DATOS LUBINA MEDITERRÁNEA DE 1996
(EXPERIMENTO 1°).

ÁREA Y NÚMERO DE FIBRAS BLANCAS.

Eclósión	T° incub.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C	46.46 (2.3)	188 (10.09)
	15 °C	54.13 (3.05)	197 (14.46)
	17 °C	46.92 (2.55)	205.35 (24.48)
	17 °C	52.21 (2.9)	171.43 (14.55)

Aspectos de la huevo (5-8 días)	T° inc./T° cul.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° Fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	73.97 (3.15)	295.4 (31.4)
	17 °C/ambiente	60.93 (7.65)	181.6 (16.35)
	15 °C/17 °C	67.62 (9.35)	195.6 (22.55)
	17 °C/17 °C	75.15 (7.43)	212.6 (16.17)

15 días	T° inc./T° cul.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° Fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	51.5 (2.46)	331.35 (32.93)
	17 °C/ambiente	62.8 (7.88)	287 (18.21)
	15 °C/17 °C	109.78 (12.92)	335.1 (45.95)
	17 °C/17 °C	92.096 (13.8)	289.6 (24.32)

25 días	T° inc./T° cul.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° Fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	273.79 (26.65)	1459.6 (35.54)
	17 °C/ambiente	232.57 (20.56)	1343.2 (139.16)
	15 °C/17 °C	346.34 (21.65)	2772.4 (246.05)
	17 °C/17 °C	300.47 (45.57)	2576.9 (205.54)

50 días.	T° inc./T°cult.	Área fibras blancas (μm^2) X (sem)	N° fibras blancas X (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	367.69 (38.07)	2580 (129.18)
	17 °C/ambiente	473.97 (31.66)	3315.6 (83.75)
	15 °C/17 °C	585.60 (63.76)	3318 (251.64)
	17 °C/17 °C	632.40 (44.02)	3669.3 (154.63)

ÁREA Y NÚMERO DE FIBRAS ROJAS.

Apertura de la boca (5-5 días)	T° inc./T°cult.	Área fibras rojas (μm^2) X (sem)	N° fibras rojas X (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	41.31 (8.88)	78 (3.40)
	17 °C/ambiente	41.81 (8.88)	76 (4.58)
	15 °C/17 °C	39.21 (8.17)	78.6 (7.01)
	17 °C/17 °C	36.89 (8.49)	101.2 (8.53)

50 días	T° inc./T°cult.	Área fibras rojas (μm^2) X (sem)	N° fibras rojas X (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	21.29 (1.84)	130.13 (3.17)
	17 °C/ambiente	21.97 (2.58)	75 (3.51)
	15 °C/17 °C	27.67 (1.85)	146.4 (3.90)
	17 °C/17 °C	22.89 (1.87)	164 (3.11)

50 días	T° inc./T°cult.	Área fibras rojas (μm^2) X (sem)	N° fibras rojas X (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	134.96 (11.58)	191.4 (16.78)
	15 °C/17 °C	220.15 (18.52)	182 (16.33)
	17 °C/ambiente	141.21 (3.8)	130.4 (3.81)
	17 °C/17 °C	183.59 (20.85)	175.4 (13.8)

50 días	T° inc./T°cult.	Área fibras rojas (μm^2) X (sem)	N° fibras rojas X (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	174.81 (8.87)	178 (11.51)
	15 °C/17 °C	220.15 (14.47)	122.2 (11.11)
	17 °C/ambiente	217.89 (11.58)	202.8 (9.9)
	17 °C/17 °C	218.62 (7.81)	202.4 (12.38)

ÁREAS TRANSVERSALES M. ROJO Y TOTAL DEL MIOTOMO.

Eclosión	T° incubación	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)	Área M. rojo (μm^2) \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	8117.6 (316.31)	1677.77 (109.22)
	15 °C/17 °C	10665.4 (1189.477)	1793.58 (205.06)
	17 °C/ambiente	9134 (724.99)	1746.059 (130.63)
	17 °C/17 °C	8813.05 (1336.656)	1763.05 (1947.02)

Apertura de la boca (5-8 días)	T° inc./T° cult.	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)	Área M. rojo (μm^2) \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	15 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	15 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	17 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)

20 días	T° inc./T° cult.	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)	Área M. rojo (μm^2) \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	15 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	15 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	17 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)

25 días	T° inc./T° cult.	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)	Área M. rojo (μm^2) \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	17 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	15 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	17 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)

30 días	T° inc./T° cult.	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)	Área M. rojo (μm^2) \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	17 °C/ambiente	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	15 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)
	17 °C/17 °C	13707 (794.69)	2563.649 (316.97)

Escamación (78-110 días)	T ^{inc.} /T ^{cult.}	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	5357450 (1688131)
	17 °C/ambiente	3580559 (188819.2)
	15 °C/17 °C	7734632 (435917)
	17 °C/17 °C	8366288 (918435.5)

**DATOS LUBINA ATLÁNTICA Y MEDITERRÁNEA DE 1997
(EXPERIMENTO 2°).**

ÁREA, DIÁMETRO MÍNIMO Y N° DE FIBRAS BLANCAS.

Eclosión.	T° incub.	Área fibras blancas (µm²). \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (µm²). \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C	57.872 (3.76)	6.95 (0.32)	241.2 (18.39)
	17 °C	49.874 (3.7)	6.58 (0.23)	251.6 (26.17)
Lubina mediterránea	15 °C	44.335 (3.02)	6.19 (0.23)	218.286 (11.04)
	17 °C	61.038 (2.06)	7.36 (0.13).	230.5 (10.12)

Apertura de la boca (3-6 días)	T° inc./T° cult.	Área fibras blancas (µm²) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (µm²) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	58.018 (4.54)	7.6 (0.29)	241.6 (7.44)
	17 °C/ambiente	64.308 (3.8)	7.47 (0.17)	280.4 (8.63)
	15/19 °C	83.672 (7.19)	8.391(0.34)	275.2 (13.17)
	17/19 °C	85.926 (5.35)	8.39 (0.27)	256 (17.51)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	105.668 (7.25)	9.417 (0.32)	209.6 (8.47)
	17 °C/ambiente	97.823 (7.93)	9.382 (0.41)	225.5 (16.99)
	15/19 °C	90.133 (10.76)	8.861(0.59)	218 (15.01)
	17/19 °C	88.71 (8.21)	8.942 (0.41)	212.4 (16.99)

20 días	T° inc. /T° cul.	Área fibras blancas (µm²) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (µm²) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	142.422 (9.88)	11.23 (0.49)	811.2 (36.39)
	17 °C/ambiente	129.673 (7.72)	10.91 (0.35)	639.6 (80.56)
	15/19 °C	170.471 (11.78)	12.50 (0.31)	1444 (320.41)
	17/19 °C	148.33 (12.59)	11.38 (0.46)	1206.4 (177.23)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	196.54 (8.24)	13.08 (0.31)	862.8 (47.98)
	17 °C/ambiente	159.964 (7.43)	11.213 (0.21)	823.2 (67.56)
	15/19 °C	202.33 (17.25)	13.14 (0.71)	1525.6 (202.25)
	17/19 °C	264.351 (18.78)	15.07 (0.56)	1793 (146.28)

Inicio del desfile (48-55 días)	T° inc. /T° cul.	Área fibras blancas (µm²) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (µm²) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	328.927 (34.37)	21.81 (1.1)	2947.2 (148.6)
	17 °C/ambiente	454.536 (40.7)	20.43 (1.11)	3270 (352.67)
	15/19 °C	554.521 (68.66)	21.38 (1.17)	3306.4 (137.46)
	17/19 °C	518.202 (17.21)	21.48 (0.37)	2130.8 (374.81)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	543.522 (38.41)	21.61 (0.73)	2861.6 (116.29)
	17 °C/ambiente	543.534 (36.01)	21.26 (1.74)	2848.4 (233.06)
	15/19 °C	671.728 (43.89)	22.34 (1.09)	3536.4 (239.49)
	17/19 °C	607.492 (35.26)	21.42 (0.79)	3545.6 (471.82)

Escamación (52-73 días)	T° inc. / T° cul.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	551.758 (43.58)	21.43 (0.69)	3198.4 (131.28)
	17 °C/ambiente	708.114 (39.72)	23.76 (0.83)	3366.4 (199.68)
	15/19 °C	612.885 (21.99)	22.33 (0.74)	3953.6 (150.31)
	17/19 °C	529.382 (21.44)	20.27 (0.81)	3916.8 (95.56)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	734.52 (44.06)	24.6 (0.77)	3162.4 (68.19)
	17 °C/ambiente	937.476 (121.15)	27.76 (2.05)	3726.4 (230.23)
	15/19 °C	671.728 (48.89)	22.34 (1.09)	3926.4 (239.49)
	17/19 °C	607.452 (35.22)	21.42 (0.79)	3565.6 (471.48)

90 días	T° inc. / T° cul.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem) (M. blanco/área fibras blancas)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	551.758 (43.58)	21.43 (0.69)	3198.4 (131.28)
	17 °C/ambiente	708.114 (39.72)	23.76 (0.83)	3366.4 (199.68)
	15/19 °C	612.885 (21.99)	22.33 (0.74)	3953.6 (150.31)
	17/19 °C	529.382 (21.44)	20.27 (0.81)	3916.8 (95.56)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	734.52 (44.06)	24.6 (0.77)	3162.4 (68.19)
	17 °C/ambiente	937.476 (121.15)	27.76 (2.05)	3726.4 (230.23)
	15/19 °C	671.728 (48.89)	22.34 (1.09)	3926.4 (239.49)
	17/19 °C	607.452 (35.22)	21.42 (0.79)	3565.6 (471.48)

Área, diámetro mínimo y nº de fibras blancas

Escamación	T° inc. / T° cul.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C	551.758 (43.58)	21.43 (0.69)	3198.4 (131.28)
Lubina atlántica	17 °C	708.114 (39.72)	23.76 (0.83)	3366.4 (199.68)
Lubina mediterránea	15 °C	734.52 (44.06)	24.6 (0.77)	3162.4 (68.19)
Lubina mediterránea	17 °C	937.476 (121.15)	27.76 (2.05)	3726.4 (230.23)

Apertura de la boca (2-6 días)	T° inc. / T° cul.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	24.022 (1.14)	4.084 (0.16)	158.8 (4.54)
	17 °C/ambiente	21.264 (1.04)	4.059 (0.16)	121.4 (5.08)
	15/19 °C	26.928 (1.02)	4.066 (0.16)	121.4 (4.57)
	17/19 °C	24.588 (1.01)	4.078 (0.16)	121.4 (4.21)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	50.888 (1.54)	4.205 (0.17)	115.8 (1.54)
	17 °C/ambiente	24.974 (1.01)	4.014 (0.16)	121 (4.18)
	15/19 °C	31.87 (1.51)	4.028 (0.16)	116 (4.51)
	17/19 °C	31.44 (1.51)	4.157 (0.17)	121.8 (4.61)

20 días	T° inc. /T° cul.	Área fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	N° fibras rojas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	55.943 (2.35)	5.95 (0.21)	146 (6.13)
	17 °C/ambiente	63.934 (5.25)	6.589 (0.26)	136.8 (7.39)
	15/19 °C	68.03 (7.37)	7.26 (0.39)	168.4 (10.998)
	17/19 °C	69.034 (2.52)	7.271 (0.1)	156.8 (4.223)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	104.098 (6.83)	8.052 (0.39)	139.6 (1.83)
	17 °C/ambiente	98.28 (9.66)	7.92 (0.38)	134 (8.53)
	15/19 °C	85.85 (9.15)	7.84 (0.37)	176.8 (12.09)
	17/19 °C	116.5 (8.62)	9.11 (0.53)	161.6 (5.15)

Inicio del destete (48-55 días)	T° inc. /T° cul.	Área fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	N° fibras rojas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	158.178 (8.39)	10.611 (0.33)	204 (12.64)
	17 °C/ambiente	200.269 (13.8)	11.857 (0.7)	226.4 (4.11)
	15/19 °C	210.868 (23.2)	12.344 (0.73)	269 (35.15)
	17/19 °C	175.55 (10.5)	11.557 (1.5)	226.4 (35.15)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	175.55 (10.5)	11.557 (1.5)	226.4 (35.15)
	17 °C/ambiente	200.269 (13.8)	11.857 (0.7)	226.4 (4.11)
	15/19 °C	210.868 (23.2)	12.344 (0.73)	269 (35.15)
	17/19 °C	158.178 (8.39)	10.611 (0.33)	204 (12.64)

Inicio del destete (55-58 días)	T° inc. /T° cul.	Área fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	N° fibras rojas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	158.178 (8.39)	10.611 (0.33)	204 (12.64)
	17 °C/ambiente	200.269 (13.8)	11.857 (0.7)	226.4 (4.11)
	15/19 °C	210.868 (23.2)	12.344 (0.73)	269 (35.15)
	17/19 °C	175.55 (10.5)	11.557 (1.5)	226.4 (35.15)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	175.55 (10.5)	11.557 (1.5)	226.4 (35.15)
	17 °C/ambiente	200.269 (13.8)	11.857 (0.7)	226.4 (4.11)
	15/19 °C	210.868 (23.2)	12.344 (0.73)	269 (35.15)
	17/19 °C	158.178 (8.39)	10.611 (0.33)	204 (12.64)

ÁREAS TRANSVERSALES BLANCO, ROJO Y TOTAL DEL MIOTUBO.

Salvado	T° Incub.	Área BL. Blanco (µm²) \bar{X} (sem)	Área BL. Rojo (µm²) \bar{X} (sem)	Área total Miótubos (µm²) \bar{X} (sem)	% Blanco \bar{X} (sem)	% Rojo \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C	1422.01 (268.8)	1950.02 (37.52)	16177.84 (261.88)	88.46 (2.05)	11.51 (2.05)
	17 °C	2139.82 (1376.54)	2075.97 (119.54)	17415.75 (174.748)	81.21 (1.37)	18.79 (1.37)
Lubina mediterránea	15 °C	2092.7 (1038.16)	1747.48 (265.49)	20964.2 (199.3)	81.8 (2.39)	18.2 (2.39)
	17 °C	1908.22 (1614.58)	2482.66 (57.68)	14291.48 (290.07)	80.87 (1.54)	19.13 (1.54)

Apertura De la boca (3-6 días)	T° inc. / T° cul.	Área M. Blanco (μm^2) \bar{X} (sem)	Área M. Rojo (μm^2) \bar{X} (sem)	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)	%Blanco \bar{X} (sem)	%Rojo \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	12518.04 (747.9)	2663.98 (53.27)	15182.03 (777.56)	82.31 (0.75)	17.69 (0.75)
	17 °C/ambiente	14577.4 (977.07)	3565.755 (365.83)	18143.16 (1315.2)	80.47 (0.84)	19.53 (0.84)
	15/19 °C	18717.09 (560.7)	3248.268 (181.48)	21965.35 (417.68)	85.14 (1.06)	14.85 (1.06)
	17/19 °C	17045.68 (412.3)	2662.02 (70.9)	19707.7 (430.08)	86.48 (0.36)	13.52 (0.36)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	15441.56 (658.7)	3495.47 (163.7)	18937.03 (781.67)	81.52 (0.58)	18.48 (0.58)
	17 °C/ambiente	17121.26 (1036.68)	3396.33 (270.85)	20517.59 (1261.88)	83.48 (0.64)	16.52 (0.64)
	15/19 °C	15414.3 (775.65)	3289.68 (163.74)	18703.99 (634.99)	82.32 (1.4)	17.68 (1.4)
	17/19 °C	15784.48 (1056.326)	3688.74 (196.82)	19473.22 (1132.58)	80.92 (1.16)	19.08 (1.16)

20 días	T° inc. / T° cul.	Área M. Blanco (μm^2) \bar{X} (sem)	Área M. Rojo (μm^2) \bar{X} (sem)	Área total Miotomo (μm^2) \bar{X} (sem)	%Blanco \bar{X} (sem)	%Rojo \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	53732.64 (6109.2)	7642.92 (226.77)	61375.57 (6300.29)	87.22 (0.83)	12.78 (0.83)
	17 °C/ambiente	46275.57 (7091.2)	7689.59 (926.96)	53965.16 (7828.68)	85.38 (1.04)	14.61 (1.04)
	15/19 °C	59793.02 (21628.77)	11359.01 (1783.29)	71152 (23117.23)	89.05 (1.18)	10.95 (1.18)
	17/19 °C	87821.73 (13043.86)	9731.47 (943.16)	97553.19 (13745.38)	89.41 (1.15)	10.59 (1.15)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	66688.74 (4210.106)	15144.12 (548.97)	81832.86 (6280.05)	81.52 (1.04)	18.48 (1.04)
	17 °C/ambiente	63081.97 (7673.92)	12836.91 (688.57)	75918.89 (8421.256)	82.79 (0.96)	17.21 (0.96)
	15/19 °C	119854.3 (15589.03)	17583.06 (1997.194)	137437.3 (17257.21)	86.92 (0.87)	13.08 (0.87)
	17/19 °C	161816.3 (26392.19)	18796.96 (1804.43)	180613.3 (28190.15)	89.2 (0.69)	10.79 (0.69)

Inicio del destete (48-55 días)	T° inc. /T° cul.	Área M. blanco (µm ²) X̄ (sem)	Área M. Rojo (µm ²) X̄ (sem)	Área total Miotomo (µm ²) X̄ (sem)	%Blanco X̄ (sem)	%Rojo X̄ (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	976793 (112053.9)	59729.03 (9120.47)	1036522 (121068.6)	94.3 (0.19)	5.69 (0.19)
	17 °C/ambiente	791295.4 (89987.16)	54699.04 (5889.96)	845994.5 (92277.26)	93.38 (0.73)	6.62 (0.73)
	15/19 °C	1487073 (202041)	99496.93 (14837.14)	1586570 (216471.7)	93.76 (0.18)	6.23 (0.18)
	17/19 °C	1026914 (99878.34)	60756.75 (11327.21)	1087670 (108271.7)	94.5 (0.78)	5.5 (0.78)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	934523.5 (84949.08)	72443.14 (5207.19)	1006967 (89238.01)	92.74 (0.36)	7.26 (0.36)
	17 °C/ambiente	1437075 (279602.4)	91284.01 (14923.68)	1528359 (293331.8)	93.68 (0.56)	6.31 (0.56)
	15/19 °C	2366548 (554934)	134319.5 (27177.07)	2500868 (577535.9)	94.53 (0.73)	5.47 (0.73)
	17/19 °C	1909715 (345237)	115695.3 (18922.06)	2025410 (262263.1)	94.31 (0.17)	5.69 (0.17)

Inicio del destete (48-55 días)	T° inc. /T° cul.	Área M. blanco (µm ²) X̄ (sem)	Área M. Rojo (µm ²) X̄ (sem)	Área total Miotomo (µm ²) X̄ (sem)	%Blanco X̄ (sem)	%Rojo X̄ (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	976793 (112053.9)	59729.03 (9120.47)	1036522 (121068.6)	94.3 (0.19)	5.69 (0.19)
	17 °C/ambiente	791295.4 (89987.16)	54699.04 (5889.96)	845994.5 (92277.26)	93.38 (0.73)	6.62 (0.73)
	15/19 °C	1487073 (202041)	99496.93 (14837.14)	1586570 (216471.7)	93.76 (0.18)	6.23 (0.18)
	17/19 °C	1026914 (99878.34)	60756.75 (11327.21)	1087670 (108271.7)	94.5 (0.78)	5.5 (0.78)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	934523.5 (84949.08)	72443.14 (5207.19)	1006967 (89238.01)	92.74 (0.36)	7.26 (0.36)
	17 °C/ambiente	1437075 (279602.4)	91284.01 (14923.68)	1528359 (293331.8)	93.68 (0.56)	6.31 (0.56)
	15/19 °C	2366548 (554934)	134319.5 (27177.07)	2500868 (577535.9)	94.53 (0.73)	5.47 (0.73)
	17/19 °C	1909715 (345237)	115695.3 (18922.06)	2025410 (262263.1)	94.31 (0.17)	5.69 (0.17)

Temperatura	T° inc. /T° cul.	Área M. blanco (µm ²) X̄ (sem)
Lubina atlántica	15 °C/ambiente	976793 (112053.9)
	17 °C/ambiente	791295.4 (89987.16)
	15/19 °C	1487073 (202041)
	17/19 °C	1026914 (99878.34)
Lubina mediterránea	15 °C/ambiente	934523.5 (84949.08)
	17 °C/ambiente	1437075 (279602.4)
	15/19 °C	2366548 (554934)
	17/19 °C	1909715 (345237)

LUBINA ATLÁNTICA DE 1998 (EXPERIMENTO 3º).

ÁREA, DIÁMETRO MÍNIMO Y N° FIBRAS BLANCAS.

Eclosión	T° Incub.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C	47.2 (2.79)	6.4 (0.2)	217.6 (8.45)

Apertura de la boca (3-4 días)	T° inc./T° cult.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	92.75 (4.24)	9.01 (0.18)	243.2 (20.18)
	19/19 °C	85.31 (4.38)	8.53 (0.19)	235.8 (14.52)

28 días	T° inc./T° cult.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	146.64 (17.66)	11.5 (0.74)	1020 (76.06)
	19/19 °C	189.35 (14.31)	12.21 (0.61)	1640 (226.1)

48 días	T° inc./T° cult.	Área fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras blancas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras blancas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	394.26 (27.03)	18.79 (0.68)	2648 (203.07)
	19/19 °C	561.59 (23.319)	21.64 (0.65)	3468 (253.02)

AREA, DIÁMETRO MÍNIMO Y N° FIBRAS ROJAS.

Eclosión	T° Incubación	Área fibras rojas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras rojas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras rojas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C	12.64 (1.54)	1.2 (0.07)	111.6 (4.16)

Apertura de la boca (3-4 días)	T° inc./T° cult.	Área fibras rojas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras rojas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras rojas \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	22.15 (1.57)	1.54 (0.14)	97 (4.54)
	19/19 °C	26.61 (1.51)	1.18 (0.13)	136.2 (2.17)

28 días	T° inc./T° cult.	Área fibras rojas (μm^2) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras rojas (μm^2) \bar{X} (sem)	N° fibras rojas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	62.7 (7.56)	7.19 (0.36)	100.8 (41.85)
	19/19 °C	83.53 (4.79)	7.52 (0.36)	130.8 (3.71)

40 días	T ° inc./T° cult.	Área fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	Diámetro mínimo fibras rojas (µm²) \bar{X} (sem)	N° fibras rojas. \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	178.94 (22.35)	12.26 (0.93)	174.67 (3.53)
	19/19 °C	360.9 (4.66)	17.05 (0.44)	182 (4.16)

ÁREAS TRANSVERSALES M. BLANCO, ROJO Y TOTAL DEL MIOTOMO.

Eclosión	T° incub.	Área M. blanco (µm²) \bar{X} (sem)	Área M. Rojo (µm²) \bar{X} (sem)	Área total Miotomo (µm²) \bar{X} (sem)	%Blanco \bar{X} (sem)	%Rojo \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C	8848.86 (230.67)	1416.79 (111.34)	10265.65 (264.6)	86.21 (0.98)	13.78 (0.98)

Apertura de la boca (3-4 días)	T ° incub./T° cult.	Área M. blanco (µm²) \bar{X} (sem)	Área M. Rojo (µm²) \bar{X} (sem)	Área total Miotomo (µm²) \bar{X} (sem)	%Blanco \bar{X} (sem)	%Rojo \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	19652.12 (1453.52)	3169.21 (124.86)	22821.33 (1447.94)	85.87 (1.11)	14.12 (1.11)
	19/19 °C	18460.61 (1544.4)	3537.14 (249.59)	21997.74 (1726.54)	83.77 (0.89)	16.23 (0.89)

20 días	T ° inc./T° cult.	Área M. blanco (µm²) \bar{X} (sem)	Área M. Rojo (µm²) \bar{X} (sem)	Área total Miotomo (µm²) \bar{X} (sem)	%Blanco \bar{X} (sem)	%Rojo \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	72114.31 (12432.85)	8402.08 (1251.81)	80516.4 (13344.329)	89.27 (0.98)	10.72 (0.98)
	19/19 °C	141074.2 (31802.76)	13938.93 (1886.38)	155013.1 (33054.99)	89.76 (1.51)	10.24 (1.51)

40 días	T ° inc./T° cult.	Área M. blanco (µm²) \bar{X} (sem)	Área M. Rojo (µm²) \bar{X} (sem)	Área total Miotomo (µm²) \bar{X} (sem)	%Blanco \bar{X} (sem)	%Rojo \bar{X} (sem)
Lubina atlántica	19 °C/ambiente	667306.7 (81540.79)	41026.08 (3674.02)	708332.8 (84593.02)	94.11 (0.42)	5.88 (0.42)
	19/19 °C	1496157 (123877.7)	92591.72 (4807.89)	1588749 (124344)	94.05 (0.5)	5.95 (0.5)

