



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

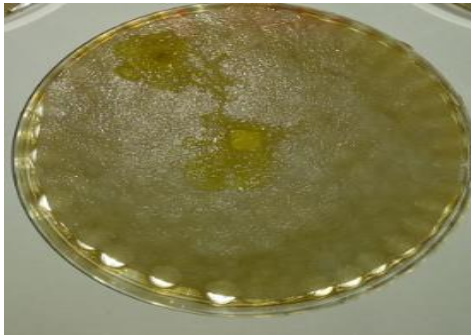
Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Análisis del ciclo vital del hongo plasmodial *Physarum polycephalum* Schwein. (Myxomycota)

Análise do ciclo vital do fungo plasmodial *Physarum polycephalum* Schwein. (Myxomycota)

Life cycle analysis in the plasmodial fungus *Physarum polycephalum* Schwein. (Myxomycota)



Miguel Menéndez Ramos

Curso: 2020- 2021. Convocatoria: Julio

Director 1: Carmen Rioboo Blanco

Director 2: Manuel Pimentel Pereira

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Palabras clave	
Lista de abreviaturas	3
1. Introducción	4
2. Objetivos	7
3. Material y métodos	8
4. Resultados y discusión	13
5. Conclusiones / Conclusions	20
6. Bibliografía	23

Resumen

Este trabajo se centra en el análisis de la fase asexual (plasmodial) de *Physarum polycephalum* Schwein, así como en describir las condiciones óptimas para su cultivo en el laboratorio. En el desarrollo del estudio se atendió a los siguientes factores: cepa cultivada, estado del inóculo inicial, tipo de medio (definidos frente a semi-definidos), temperatura óptima del cultivo o uso de agentes antifúngicos (nistatina). Asimismo, se probaron diversas formas de análisis del crecimiento del plasmodio de *P. polycephalum*, tanto medidas directas (tamaño y velocidad del crecimiento) como indirectas mediante el análisis de parámetros fisiológicos (observación de las corrientes citoplasmáticas y ensayo de colorantes vitales).

Entre las posibilidades ensayadas, tanto los medios semidefinidos como el medio suplementado con avena en copos permitieron el desarrollo del plasmodio, si bien el crecimiento observado fue diferente. No se observaron diferencias en el desarrollo de los plasmodios según las cepas empleadas o dependiendo de las características del inóculo. Asimismo, se observó que temperaturas de cultivo inferiores a las recomendadas en la bibliografía permiten el desarrollo del plasmodio, y se estableció la concentración de nistatina que permite el crecimiento de *P. polycephalum* evitando la aparición de contaminantes fúngicos. El desarrollo del plasmodio solo se pudo evaluar mediante la observación directa de su crecimiento, los parámetros fisiológicos considerados no resultaron útiles.

Palabras clave: condiciones óptimas de cultivo, *Physarum polycephalum*, plasmodio.

Abstract

This work focuses on the analysis of the asexual (plasmodial) phase of *Physarum polycephalum* Schwein, as well as on describing the optimal conditions for its culture. We considered the following factors: cultured strain, initial inoculum, culture medium (defined versus semi-defined), optimal culture temperature and use of antifungal agents (nystatin). Likewise, various forms of analysis of plasmodium growth were tested, both direct measurements (size and growth rate) and indirect measurements through the analysis of physiological parameters (observation of cytoplasmic currents and application of vital stains).

Among the possibilities tested, both the semi-defined media and the medium supplemented with oat flakes allowed the growth of plasmodia, although their morphologies were different. No differences were observed in the development of plasmodia according to the strains used or depending on the characteristics of the inoculum. Also, it was observed that culture temperatures lower than those recommended in the bibliography allow the development of plasmodia, and we established the nystatin concentration that allows the growth of *P. polycephalum* while avoiding the appearance of fungal contaminants. The development of plasmodia could only be assessed by direct observation of its growth, whereas the physiological parameters considered were not useful.

Key words: Optimal culture conditions, *Physarum polycephalum*, plasmodium

Lista de abreviaturas

DMSO (Dimetilsulfóxido/dimethyl sulfoxide)

MAC (Medio de Avena en Copos)

MMA (Medio de Madera de Abedul)

MPC (Medio *Physarum* de Carne)

MPCC (Medio *Physarum* de Cerebro y Corazón)

MPH (Medio *Physarum* de Hemina)

PBS (Tampón fosfato salino/phosphate buffered saline)

TTC (Cloruro de trifenil tetrazolio/2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)

1. Introducción

Physarum polycephalum Schwein (Physaraceae, Physarales, Myxomycota) es uno de los hongos myxomycetos (hongos mucilaginosos, Myxogastria) más comúnmente cultivados en laboratorio para su utilización tanto en docencia como en investigación, si bien es raro en el medio natural (*e.g.* Schnittler *et al.*, 2012). El plasmodio de *P. polycephalum* (**Fig. 1**) es de tipo faneroplasmodio y de color amarillo, blanco o rojizo. Consiste en una red robusta y extensa de venas gruesas que en las zonas apicales se extienden formando una hoja continua de protoplasma que termina en una o más extensiones en forma de abanicos carnosos. Esta especie se caracteriza además por sus esporocarpos pedunculados, de redondeados a ovoides, y por sus esporas ornamentadas de violetas a marrones (Schnittler *et al.*, 2012). La coloración brillante del plasmodio se debe a la acumulación de gránulos del pigmento physarocromo A (all-trans-N- [11-(2-acetilamino-3-hidroxifenil)-2,4,6,8,10-undecapentaenol]-S-glutamina; Aldrich & Daniel, 1982; Li *et al.*, 2020), cuya función no ha sido descrita hasta la fecha, si bien se considera que está relacionada con el fototropismo y la recepción de señales para el ciclo reproductivo sexual (Li *et al.*, 2020).

La distribución geográfica original de la especie es poco conocida, aunque crece principalmente en climas de templados a tropicales, siendo su hábitat principal las acumulaciones de material vegetal en descomposición. Se alimenta de bacterias, levaduras y materia orgánica (*e.g.*, Alim *et al.*, 2013), creciendo sobre o justo debajo de la superficie del sustrato (Clark & Haskins, 2010). Ecológicamente, *P. polycephalum* es considerado un organismo saprófito secundario, en línea con los restantes myxomycetes, a los que colectivamente se ha atribuido un importante papel en el ciclo de nutrientes del suelo (*e.g.*, Adl & Gupta, 2006).

El ciclo vital de la especie (**Fig. 2**), que consta de varias fases, es bien conocido por ser *P. polycephalum* un organismo modelo dentro de los Myxomycota-Myxogastria y de los organismos ameboides en general (Boussard *et al.*, 2021). Durante la fase de plasmodio (diploide), en la que se centra este trabajo, el hongo se presenta como una masa sincitial multinucleada de vida libre, en la que los núcleos se dividen de forma coordinada y cuyo crecimiento está mediado por fuertes corrientes citoplasmáticas (Alim *et al.*, 2013). Esta fase plasmodial móvil y asexual es la que representa la mayor parte del ciclo de vida del organismo, quedando la reproducción sexual restringida a condiciones ambientales particulares, ligadas fundamentalmente a la escasez de recursos (Clark & Haskins, 2010).

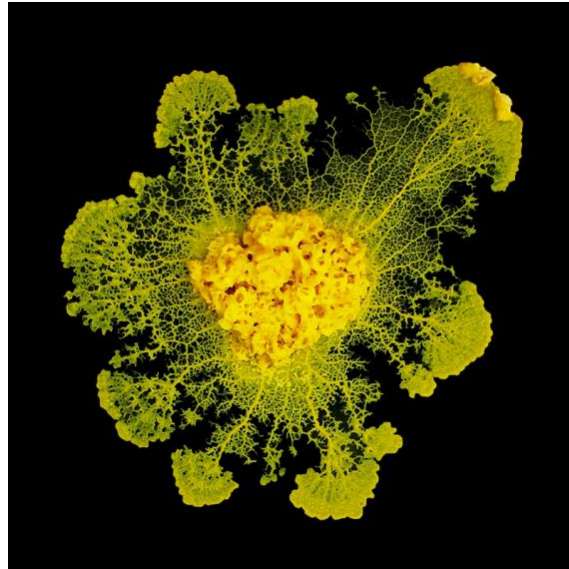


Fig. 1. Plasmodio de *P. polycephalum*. Imagen extraída de Blob Shop (<https://blobshop.fr/>; fecha de consulta: 5/7/2021)

Desde el punto de vista de la estructura del ciclo, el plasmodio constituye el esporófito diploide de la especie y se va a formar a través de la fusión de los gametos, que en este caso se identifican con los gametófitos. Se trata de amebas haploides que emergen de las esporas de resistencia de origen sexual. Estas amebas podrán ser flageladas o no dependiendo del nivel de humedad del ambiente de germinación. La esporulación se produce a partir de los llamados sorocarpos o cuerpos fructíferos, meiosporocistes originados en el plasmodio endurecido o esclerocio (Schnittler *et al.*, 2012) y cuya formación se relaciona con la combinación de luz solar (principalmente la radiación situada en el azul y ultravioleta; Nowak & Steffan, 1998) y la falta de recursos en el medio. Las esporas y el esclerocio son las fases principales de resistencia del organismo, si bien las primeras se relacionan con la dispersión, mientras que el esclerocio tiene más que ver con la supervivencia *in situ* (Clark & Haskins, 2010).

El ciclo vital de *P. polycephalum* fue descrito por primera vez por Howard (1931), quien ya señaló la importancia de establecer un sistema apropiado de cultivo para este organismo. El interés por esta especie se incrementó en los años 70 y 80, cuando se llevaron a cabo numerosos estudios acerca de su desarrollo y diferenciación, ciclo de vida y motilidad (*e.g.*, Adler *et al.*, 1975, Gorman *et al.*, 1979). Fue precisamente durante estos años cuando *P. polycephalum* se adoptó como especie modelo, debido especialmente a su división sincrónica nuclear (llegando a miles de núcleos divididos cada 8-10 horas; Alim *et al.*, 2013), al gran tamaño de sus células, a la facilidad de su cultivo *in vitro*, a su flujo citoplasmático interno (corrientes citoplasmáticas) y a sus metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (revisado en Dembitsky *et al.*, 2005). Más recientemente, numerosos investigadores

han mostrado interés por la capacidad de esta especie para la coordinación del movimiento del plasmodio, lo que podría conferirle un gran valor para el estudio del origen de la coordinación en organismos aneurales (Oettmeier *et al.*, 2017). Por ejemplo, Nakagaki *et al.* (2004) observaron que la red de transporte de nutrientes y otras sustancias que genera el plasmodio siempre sigue patrones matemáticos de la forma más corta y eficiente, deduciendo que el sistema es complejo y coordinado. Además, un estudio más reciente (Mayne *et al.*, 2015) concluye que el comportamiento complejo de esta especie se debe al citoesqueleto del plasmodio, comparándolo con la red neural de otros animales y proponiendo que existe inteligencia computacional en *P. polycephalum*. Finalmente, estudios recién publicados señalan que *P. polycephalum* es capaz de aprender habilidades como la periodicidad, la habituación y la memoria de la habituación, que puede prolongarse hasta un mes en estado de latencia (Boussard *et al.*, 2021).

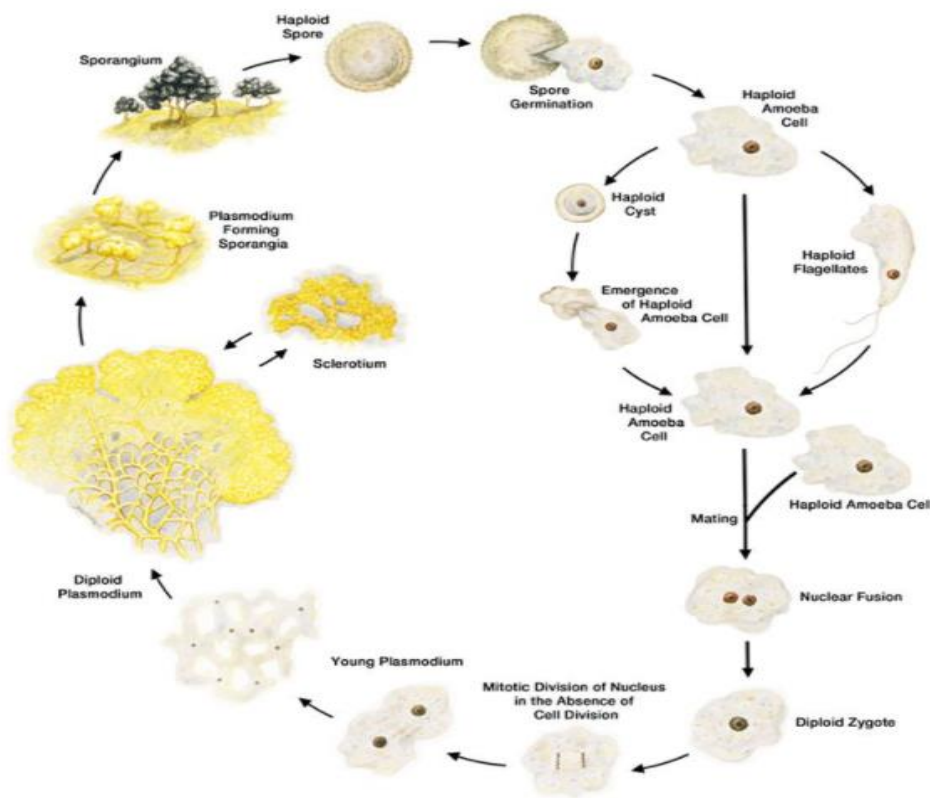


Fig. 2. Diagrama del ciclo de vida de *Physarum polycephalum*. Imagen extraída de Carolina Biological (<https://www.carolina.com/teacher-resources/Interactive/think-single-celled-organisms-are-simple-think-again-the-slime-mold-physarum-polycephalum-a-single-celled-organism-for-student-investigations/tr41405.tr>; fecha de consulta: 5/7/2021)

Como se comentó anteriormente, la posibilidad de cultivo de *P. polycephalum* en laboratorio es una de las razones por las que esta especie se utiliza como organismo modelo (Howard, 1931). La

suplementación de un medio de agar al 1,5% con copos de avena y/o con cuerpos fructíferos de distintos hongos (Howard, 1931) permite obtener buenos resultados de cara al desarrollo del plasmodio. Sin embargo, medios como éstos tienen dos problemas fundamentales (Daniel & Baldwin, 1964): (i) se trata de medios en los que la composición es compleja y, por lo tanto, no definida, además de ser susceptibles de contaminación por otros microorganismos y (ii) estos medios aseguran la supervivencia del plasmodio, pero no permiten el cierre del ciclo biológico del organismo. A este respecto, existe una gran variedad de métodos propuestos en la bibliografía, y se han probado numerosas condiciones de cultivo, pero no existe un consenso con respecto a cuál es el procedimiento más adecuado para activar bajo condiciones de laboratorio la inducción de las diferentes fases del ciclo de *P. polycephalum*.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la fase asexual de plasmodio del ciclo de *P. polycephalum* bajo diferentes condiciones de cultivo. Los aspectos considerados en este estudio fueron principalmente: (i) la cepa de partida; (ii) diferentes medios de cultivo; (iii) la forma de inoculación del organismo; (iv) el análisis del crecimiento y/o la vitalidad del plasmodio; (v) el uso de antifúngicos (la nistatina) para asegurar la pureza del cultivo y (vi) las temperaturas a emplear en el cultivo. Por último, también se intentó inducir la fase sexual de *P. polycephalum*.

3- Materiales y métodos

Para el cumplimiento de los objetivos mencionados anteriormente, se describen, a continuación, las cepas, los medios y las técnicas utilizadas. En todos los ensayos, se realizaron siempre un mínimo de 3 réplicas para cada condición estudiada.

3.1 Cepas empleadas de *P. polycephalum*

En el presente trabajo se han utilizado dos cepas de *P. polycephalum* denominadas comercialmente Charly (originaria de América del Norte) y Ava (originaria de Australia) y obtenidas de Carolina Biological (<https://www.carolina.com/>) y Blob Shop (<https://blobshop.fr/>), respectivamente. Ambas cepas se presentan en forma de esclerocio sobre papel. Al inicio de cada ensayo, las dos cepas se hidrataron mediante inmersión en tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS; pH 7,4) estéril, con el fin de estimular la reactivación del plasmodio. La conservación de las cepas en las placas se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.2 Estudio del crecimiento de la fase asexual de *P. polycephalum*

3.2.1. Medios de cultivo utilizados

Para el crecimiento de *P. polycephalum* se ensayaron diferentes medios de cultivo y fuentes de alimento:

-Medio basado en avena en copos situados sobre una lámina de agar al 1% (p/v) en agua destilada (MAC). Los copos se obtuvieron comercialmente y fueron empleados directamente (sin procesado).

-Medio basado en madera de abedul (*Betula alba* L.) en fibras en descomposición, sobre una lámina de agar al 1% (p/v) en agua destilada (MMA) ya que en la naturaleza este organismo se desarrolla en troncos en descomposición. La madera fue recogida en el Monte da Fraga (A Zapateira, A Coruña).

-Medio *Physarum* con extracto de carne (Cultimed; Panreac) (MPC) con agar al 1% (p/v) basado en el conocido como Medio Semidefinido *Physarum* descrito por Daniel & Baldwin (1964) y modificado en el presente trabajo. Se sustituyó el extracto de embrión de pollo del medio original por extracto de carne. La composición final se recoge en la **Tabla 1**.

-Medio *Physarum* con extracto de cerebro y corazón (MPCC) con agar al 1% (p/v) basado en el conocido como Medio Semidefinido *Physarum* descrito por Daniel & Baldwin (1964) y modificado en el presente trabajo, sustituyendo el extracto de embrión de pollo del original por extracto de cerebro

y corazón. La composición final es la referida en la **Tabla 1**, sustituyendo el extracto de carne por extracto de cerebro y corazón (Cultimed; Panreac).

Tabla 1. Composición del Medio Semidefinido *Physarum*, modificado de Daniel & Baldwin (1964)

Compuesto	Cantidad para una disolución de 100 ml
Triptona (Difco)	1,0 g
Extracto de levadura (Difco)	0,15 g
Glucosa anhidra	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,06g
MgSO ₄ - 7H ₂ O	0,006g
FeCl ₂ -4H ₂ O	0,006g
MnCl ₂ -4H ₂ O	0,0084g
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,0034g
ácido cítrico- H ₂ O	0,048g
HCl	0,006 ml
Agua destilada	Hasta 100 ml
CaCO ₃	0,30g
Extracto de carne	1,5 ml

3.2.2 Inoculación del organismo

En los diferentes medios de cultivo ensayados, se llevó a cabo la inoculación de dos formas diferentes: (i) a partir del esclerocio que está en el papel comercial y (ii) a partir de plasmodio activo (trasplante). En el primer caso, se hidrató el esclerocio en PBS antes de inocularlo para activarlo y fomentar su paso a la fase de plasmodio. Una vez hidratado, se situó el fragmento de esclerocio en el centro del medio empleando unas pinzas esterilizadas.

En el segundo caso, se empleó un bisturí esterilizado para cortar una sección apical de plasmodio activo crecido en medio sólido. Se cortaron las zonas apicales por su mayor vitalidad, seleccionándose además aquellas de coloración más fuerte. A continuación, el segmento de plasmodio y medio se colocó en el centro de una nueva placa con la ayuda de pinzas estériles. Se realizaron los trasplantes a partir de un mismo cultivo a lo largo de varios días para comprobar el efecto de la edad del cultivo de origen en el crecimiento en las nuevas placas. Concretamente, los trasplantes fueron tras 3 y 6 días y se observaron durante 16 días.

Para ambos tipos de inoculación se siguió el mismo procedimiento, consistente en el uso de una plantilla (**Fig. 3**) para la colocación del organismo en el centro de la placa y a una distancia equidistante de los copos de avena y/o las fibras de madera (en los casos en los que se emplearon los medios MAC y MMA).

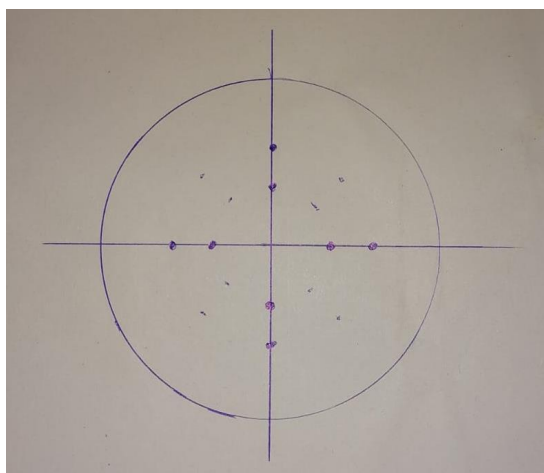


Fig. 3. Plantilla empleada en la inoculación del hongo. Los 8 puntos de los ejes se corresponden con los lugares en la placa donde se colocan los copos de avena o las fibras de madera según el caso. Los puntos cercanos al centro están a 1,5 cm de éste y los otros 4 puntos restantes se separan de 0,5 cm de los anteriores. En el centro, donde se cruzan los ejes, se coloca el inóculo de microorganismo.

3.2.3 Análisis del crecimiento del plasmodio

Con el fin de analizar el crecimiento del plasmodio, se estudiaron los siguientes parámetros:

-Análisis visual del crecimiento del plasmodio. Mediante observación de las placas, el crecimiento se registra como una variable binaria (crecimiento/no crecimiento) dependiendo de que el plasmodio se extienda más allá del punto de inoculación inicial o no.

-Análisis de la velocidad de crecimiento del plasmodio. Para ello se realizan observaciones del crecimiento del plasmodio sobre la superficie del medio de cultivo a lo largo de un periodo de tiempo

determinado, registrando el punto más distal desde el centro de la placa alcanzado por el plasmodio relativizado en función de los días transcurridos. Para poder comparar la velocidad del crecimiento entre los diversos ensayos, se establecieron marcas a alcanzar por el plasmodio de forma estandarizada. Las marcas que se tomaron como referencia fueron los lugares ocupados por los copos de avena o las fibras de madera depositados de manera radial alrededor del punto central de inoculación como se indica en el apartado 4.2.2.

-*Análisis de las corrientes citoplasmáticas en las venas del plasmodio.* Se llevaron a cabo observaciones directas bajo una lupa binocular sin necesidad de tinciones previas del plasmodio con el fin de estudiar la existencia de corrientes citoplasmáticas. Dichas corrientes citoplasmáticas son constantes en estos organismos y se relacionan directamente con el crecimiento y la actividad fisiológica del plasmodio (Westendorf *et al.*, 2018).

-*Utilización de colorantes vitales.* Varios medios de cultivo ensayados (medios MAC) se suplementaron con cloruro de trifenil tetrazolio (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC); Panreac) al 0,005% (p/v) a partir de una solución *stock* al 1% preparada en agua destilada estéril. Por la actividad de enzimas deshidrogenasas implicadas en el metabolismo celular, el TTC se reduce a formazán, un compuesto de color rojo que se acumula en el citoplasma de los organismos actuando como indicador de viabilidad (Rich, *et al.*, 2001).

-*Análisis de la contaminación del cultivo.* Dado que la presencia de otros microorganismos dificulta el desarrollo de *P. polycephalum*, se empleó como medida de la calidad del crecimiento y del cultivo. Se llevó a cabo un análisis visual de la aparición de microorganismos contaminantes y se realizaron preparaciones en fresco para su posterior observación en un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse E400), con el fin de determinar si se trataba de una contaminación bacteriana o por hongos.

3.2.4 Efecto de nistatina sobre la prevención de contaminación microbiana

Para evitar el crecimiento de otros hongos en el medio de cultivo de *P. polycephalum*, se ensaya la utilización del antifúngico nistatina (85% de pureza; Acros Organics). Su mecanismo de acción consiste en unirse a los ergosteroles que, además de tener un papel fundamental en la estructura de la membrana de los hongos, regula diversas actividades fisiológicas como la fusión homotípica de vacuolas, la endocitosis y la señalización mediada por receptores de membrana (Rivera-Toledo *et al.*, 2020). Diversos estudios usan la nistatina como antifúngico en diferentes cultivos [e.g. Villota (2019) contra *Candida albicans* (C.P.Robins) Berkhout; Cifuentes *et al.*, (1993) contra *Xanthophyllomyces dendrorhous* Golubev]; sin embargo, en los que se han revisado con respecto a cultivos de *P.*

polycephalum no se han encontrado referencias al uso de este compuesto. Cabe destacar que la nistatina, en principio, no debe ser perjudicial para el crecimiento del plasmodio ya que este organismo no es un hongo verdadero.

Este compuesto se ensayó a diferentes concentraciones finales en el medio MAC: 2 u/ml, 10 u/ml, 20 u/ml, 100 u/ml, 1000 u/ml, 2000 u/ml, 10000 u/ml. En todos los casos, dichas concentraciones se obtuvieron añadiendo el volumen necesario a partir de una solución *stock* de nistatina de 7,1 mg/ml en dimetilsulfóxido (*dimethyl sulfoxide*, DMSO). Una vez inoculadas, se realizó un seguimiento de las placas durante 3-5 días con el fin de determinar la concentración que inhibe el crecimiento de otros hongos sin afectar al crecimiento de *Physarum*. Una vez determinada la concentración adecuada se añadió a todos los demás medios utilizados para poder comparar aquellos que tuviesen nistatina con los que no y observar la eficacia de esta sustancia.

3.2.5 Efecto de la temperatura de cultivo

A partir de inoculaciones en medio MAC, se ensayaron dos temperaturas de incubación: 25°C y 18°C. La primera es la que se recomienda para el desarrollo óptimo del organismo según las instrucciones de los proveedores. La segunda se ensayó con el fin de inhibir la potencial contaminación microbiana que se pueda formar, observando si el cambio de temperatura también afectaba al crecimiento del organismo comparando ambas temperaturas.

3.3 Estudio de la inducción del ciclo sexual de *P. polycephalum*

3.3.1 Inducción de la esporulación

En este trabajo también se realizaron una serie de primeros pasos previos para obtener la esporulación.

Para ello se ensayó el medio MSP líquido sustituyendo el extracto de embrión de pollo por hemina al 80% (Sigma-Aldrich) (MPH), tal y como sugieren Daniel & Baldwin (1964). Para añadir la hemina, primero se disuelve en NaOH al 1% (p/v), consiguiendo una concentración final de 0,05% (p/v), y se añade al medio en lugar del extracto de embrión de pollo (Daniel & Baldwin, 1964).

Este medio líquido se prepara con la siguiente técnica: primero, se cubren las placas Petri con una base de esferas de cristal estériles de 6mm de diámetro. Después, encima de esta capa se coloca un papel de filtro que las cubra; a continuación, se añade el medio con una pipeta hasta que tenga la suficiente cantidad para ir cubriendo las esferas y que el papel quede embebido, pero sin que esté sumergido; por último, se inocula el hongo boca abajo y como el papel está húmedo no es necesario

hidratar el hongo con anterioridad. Esto nos permite conseguir muestras de plasmodio de una forma que resulta más fácil su trasplante a medios líquidos.

3.3.2 Inducción de la formación de microplasmodios

A partir de una muestra del plasmodio que se consigue en el medio anterior, se preparan 20 ml de medio MPH, tal y como se describe arriba, en un matraz Erlenmeyer inclinado. A continuación, se coloca una muestra del plasmodio en la pared del matraz, cerca de la superficie del medio líquido, pero sin entrar en contacto con él. El matraz se mantiene en esta posición durante 72 h y protegido de la luz.

Transcurrido ese tiempo, se procede a la agitación del matraz para conseguir microplasmodios.

Para la comprobación de crecimiento del plasmodio en medio líquido y de la formación de microplasmodios, se han realizado observaciones al microscopio de muestras del cultivo.

Por último, tanto todos los medios como todos los materiales utilizados en el presente trabajo se han esterilizado previamente en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4- Resultados y discusión

4.1 Crecimiento diferencial de cepas de *P. polycephalum*

Existen numerosas cepas de *P. polycephalum*, y por lo general, las principales diferencias entre las cepas se refieren a aspectos como la cantidad de ADN nuclear, el número de cromosomas o la capacidad de fusión con plasmodios o amebas de genotipo diferente (Kubbis *et al.*, 1986). Se trata, por lo tanto, en algunos casos, de factores que impactan en el crecimiento y reproducción del organismo. Nuestro ensayo se ha centrado en las cepas llamadas “Charly” y “Ava”, para las cuales hay poca información disponible, pero que muestran diferencias de coloración.

Los resultados de crecimiento obtenidos para ambas cepas en medio MAC muestran, tal y como se observa en la **Fig. 4**, que no hay diferencias importantes. Ambas podrán utilizarse durante los ensayos planteados en este trabajo. Por ello, la mayoría de los experimentos de este trabajo se han realizado con la cepa Ava.

Además del color, ambas cepas se van a diferenciar por su origen geográfico, habiendo sido aisladas en Norteamérica (Charly) y Australia (Ava). Resulta interesante que no se observen diferencias de crecimiento entre ellas bajo condiciones comunes de desarrollo. Es de prever que ambas cepas hayan

estado aisladas durante mucho tiempo dada la distancia entre sus orígenes, por lo que se habrán acumulado numerosas diferencias genéticas entre ellas. Sin embargo, existen muchas incógnitas con respecto a la capacidad de dispersión de los Myxomycota-Myxogastria (Stephenson, 2001). En una futura fase del estudio, se podría analizar la capacidad de fusión de plasmodios de las dos variedades.

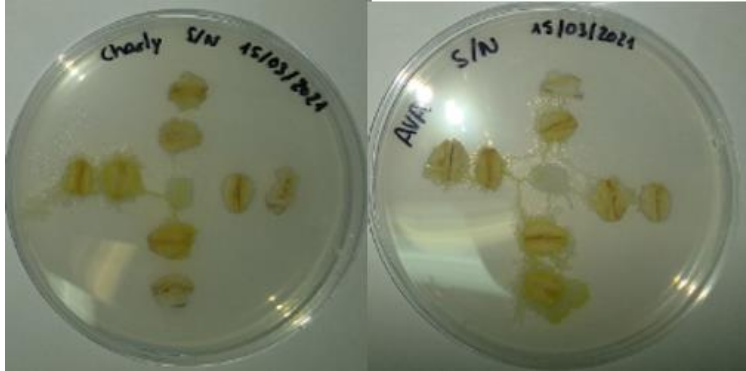


Fig. 4. Crecimiento de las cepas Charly (izquierda) y Ava (derecha), tras 2 días de la inoculación. Imágenes representativas del resultado obtenido de las 3 réplicas inoculadas. Ambas cepas cultivadas en medio MAC.

4.2 Estudio del ciclo asexual de *P. polycephalum*

4.2.1 Medio de cultivo

Por un lado, tal y como se muestra en la **Fig. 5**, el análisis del crecimiento en medio MMA muestra que el uso de las fibras de madera no permite obtener buenos resultados ya que el organismo no las utiliza como fuente de alimento y, después de varios días, acaba muriendo. Sin embargo, el medio MAC sí aporta buenos resultados de crecimiento del plasmodio y se observa cómo el organismo es capaz de colonizar todos o la mayoría de los copos de avena, sobreviviendo durante más tiempo. En concreto, han sido hasta 42 días desde su inoculación el mayor tiempo de supervivencia del plasmodio observado (con adición periódica de más copos de avena en la placa).

Considerando el hábitat característico de la especie (madera en descomposición; Alim *et al.*, 2013), destaca la baja utilización de los fragmentos de madera como fuente de nutrientes por el organismo. Sin embargo, antes de descartar por completo la madera como fuente de nutrientes, sería preciso probar con muestras en distintos estados de degradación. Asimismo, la esterilización mediante calor húmedo de la madera puede ser también un problema, ya que su degradación va también a depender de la actividad de terceros organismos que son eliminados en el proceso, si bien *P. polycephalum* presenta actividad celulasa (*e.g.* Koevenig & Liu, 1981).

Por otro lado, en lo que se refiere a los medios semidefinidos, también se observan diferencias notables en el crecimiento registrado (**Fig. 6**). Se observó que *Physarum* se extendió más en medio MPCC (medio que contiene extracto de cerebro y corazón) en comparación al crecimiento registrado en medio MPC (medio que contiene extracto de carne).

A nivel general se observa que el crecimiento en los distintos medios utilizados presenta diferencias. En el caso de medios MAC y MMA el crecimiento se extiende y se ramifica más por la superficie del medio y, sin embargo, en medios MPCC y MPC el crecimiento ha sido más continuo, pero menos extendido. Esta diferencia en el crecimiento del plasmodio se justifica probablemente por la distinta distribución de los nutrientes en los medios semidefinidos frente al medio MAC. Nuestros resultados parecen indicar que el medio MAC es el idóneo para poder obtener un crecimiento óptimo del plasmodio.



Fig. 5. Ceba Ava, tras 3 días de la inoculación. Imágenes representativas del resultado de las 3 réplicas inoculadas. Medio MMA (izquierda) y medio MAC (derecha).

4.2.2 Inoculación del organismo

Los resultados obtenidos en referencia al estado del inóculo empleado realizadas en medio MAC, desde el esclerocio o mediante trasplante de plasmodio crecido en placa, muestran que no hay diferencia de crecimiento entre ambas. Además, en la observación que se llevó a cabo a los trasplantes realizados a partir de una misma placa, pero en días diferentes, no se observó ninguna diferencia con respecto a la utilización como inóculo de plasmodios de diferentes edades. Por tanto, los resultados obtenidos muestran que la edad del plasmidio no afecta a su crecimiento al producirse una renovación de los nutrientes. Además, estos resultados indican que el crecimiento del plasmodio continúa mientras las fuentes de nutrientes no se agoten. Esto coincide con lo descrito sobre la curva del ciclo de vida de *P. polycephalum*, cuya fase exponencial (y asexual) se prolonga en presencia de alimento y en ausencia de señales ambientales relacionadas con la longitud de onda de la luz recibida por el organismo, ya que en ambientes favorables tiene fototropismo negativo, huyendo de la luz (Alim *et al.*, 2013).

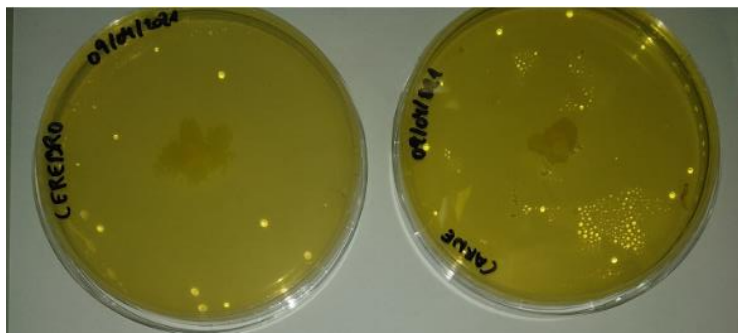


Fig. 6. Cepa Ava, tras 3 días de la inoculación. Imágenes representativas del resultado de las 3 réplicas inoculadas. A la izquierda usando el MPCC y a la derecha el MPC.

4.2.3 Análisis del crecimiento de *P. polycephalum*

A continuación, se recogen los resultados obtenidos para los diferentes parámetros ensayados en el estudio del crecimiento de *P. polycephalum*. Estos métodos se plantean como alternativa o complemento a la comprobación visual del crecimiento del plasmodio:

-Análisis de las corrientes citoplasmáticas del plasmodio. Este método es interesante como medida de la actividad fisiológica del plasmodio; sin embargo, no ha sido posible su observación porque la coloración natural del plasmodio la dificulta. Podría aplicarse a la observación de cepas mutantes que son incoloras. Por otro lado, el medio tampoco fue aplicable en los casos en los que el plasmodio adquiría una morfología en abanico sin desarrollar venas (medios semi-definidos).

-Utilización de colorantes vitales. Se utilizó el TTC para observar actividad metabólica del plasmodio ya que, al reducir ese compuesto, el resultado de la reacción se acumula y produce una coloración roja. Se llevó a cabo en medio MAC al que se le añadió el TTC. El plasmodio no fue capaz de reducir el compuesto TTC, por lo que no se pudo observar su actividad metabólica mediante esta tinción. Sin embargo, se ha observado la potencial aplicación del TTC como indicador de contaminación ya que sí se observó la tinción de otros microorganismos que contaminaban el cultivo.

-Análisis de la contaminación. Los resultados de la observación al microscopio de las muestras de la contaminación revelan que la mayoría estaba representada por bacterias y levaduras.

-El análisis de la velocidad de crecimiento del plasmodio. Se ha llevado a cabo en los medios MAC y MMA ya que son los únicos medios que tenían puntos de referencia a comparar, tal y como se

describe en materiales y métodos. Este análisis confirmó la eficacia de los copos de avena frente a las fibras de madera y la concentración idónea de nistatina.

4.2.4 Efecto de la nistatina sobre la prevención de contaminación microbiana

Por un lado, se estudió la concentración idónea de nistatina. Para ello, se inocularon tal y como se explica en materiales y métodos, en medios MAC y MMA (aunque en este medio solo la concentración más elevada ya que luego se descartó su uso por los malos resultados obtenidos). Las concentraciones más altas ensayadas, 10.000, 2.000 y 1.000 u/ml no permitieron ningún tipo de crecimiento del plasmodio. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la **Fig. 7**. Sin embargo, en las concentraciones más bajas (100, 20, 10 y 2 u/ml), tal y como se muestra en la **Fig. 8**, si se ha observado crecimiento del plasmodio no solo en el papel utilizado de inóculo, si no también colonizando la placa. Sin embargo, la concentración de 10 u/ml es la más idónea ya que es la que ha obtenido mejores resultados en relación con el crecimiento del plasmodio y a su eficacia contra la contaminación. Por ello, esta es la concentración que se ha usado en los demás medios, en los que se observó una eficacia semejante de la concentración seleccionada. Como puede observarse en la **Fig. 7**, en los medios con nistatina al cabo de varios días no detecta contaminación fúngica mientras que en los medios que no llevaban la nistatina se produce crecimiento de otros hongos.

En general, los resultados muestran que, a pesar de que el mecanismo de acción de la nistatina no afecta a *Physarum* por no ser un hongo verdadero, una alta concentración de este compuesto inhibe su crecimiento. Además, tal y como se menciona en el apartado de materiales y métodos, es la primera vez que se usa este compuesto para el cultivo de este organismo y los resultados muestran que, a la concentración idónea, evita la contaminación microbiana sin perjudicar el crecimiento del plasmodio lo que ayuda a mantener cultivos de mejor calidad.

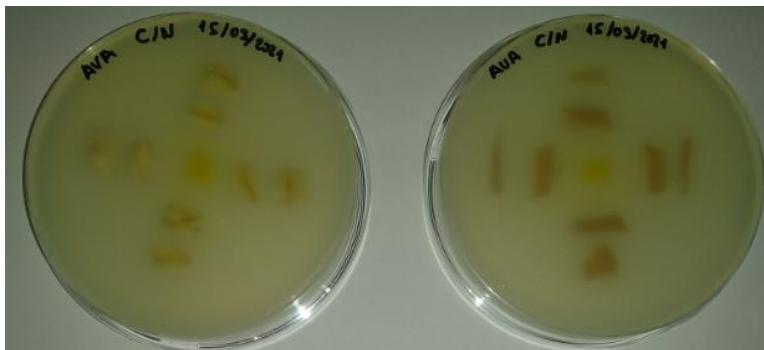


Fig. 7. Cepa Ava tras un día de su inoculación. Imágenes representativas del resultado de las 3 réplicas inoculadas. Medio MAC (izquierda) y medio MMA (derecha) ambos a una concentración de nistatina a 100000 u/ml

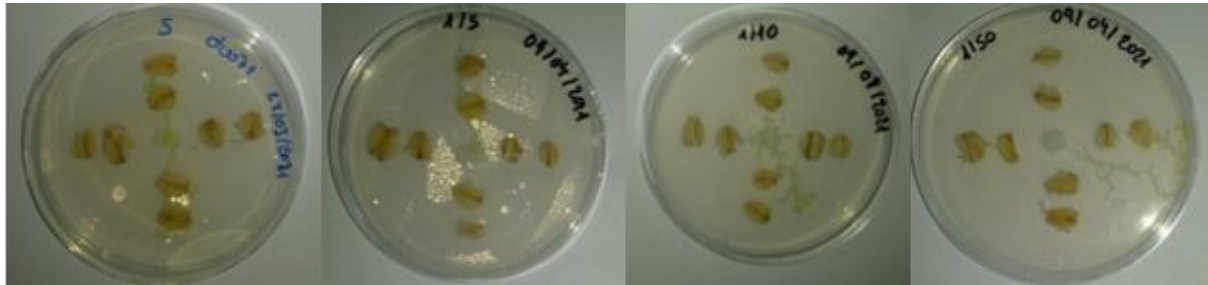


Fig. 8. Cepa Ava tras 5 días de inoculación en MAC con nistatina. Imágenes representativas del resultado de las 3 réplicas inoculadas. De izquierda a derecha las concentraciones de nistatina son: 100, 20, 10 y 2 u/ml

4.2.5 Efecto de la temperatura

Los resultados muestran que, a pesar de usar una temperatura más baja de la descrita como óptima para el crecimiento del plasmodio (Daniel & Baldwin. 1964), no hay ninguna diferencia entre el crecimiento a esta temperatura, 18°C y la óptima, 25°C. Sin embargo, la diferencia observada es que la temperatura de 18°C ralentizó la aparición de contaminación microbiana.

4.3 Estudio de la inducción del ciclo sexual de *P. polycephalum*

4.3.1 Inducción de la esporulación

Los resultados muestran, tal y como se observa en **Fig. 9**, que el plasmodio crece adecuadamente en este medio y, como en el caso de los medios MPCC y MPC, el crecimiento es continuo y no muy ramificado como ocurrían en medios MAC y MMA. Esto demuestra la capacidad del plasmodio de crecer en medios líquidos sin necesidad de usar agar.

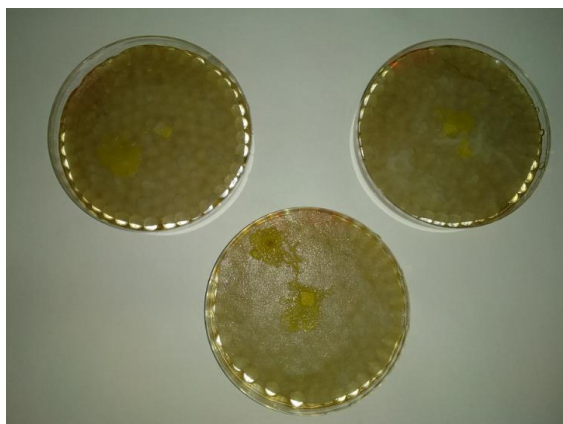


Fig. 9. Cepa Charly tras 1 día de inoculación en el medio MPH sin nistatina. Imágenes representativas del resultado de las 3 réplicas inoculadas

4.3.2 Inducción de la formación de microplasmodios

Los resultados de este procedimiento mostraron, tras las primeras 72 h de la inoculación, el crecimiento del plasmodio en el medio líquido, objetivo fundamental para poder conseguir los microplasmodios. Esto se puede observar en la **Fig. 10**.



Fig. 10. Cepa Charly tras 72 h de inoculación en el medio MPH. El matraz de la izquierda se corresponde con el medio MPH sin nistatina y el de la derecha al MPH con nistatina.

4.3.3 Estudio de la formación de microplasmodios

Los resultados de las observaciones al microscopio de los microplasmodios mostraron la ausencia de estos bajo las condiciones aplicadas para inducir su formación. Sin embargo, se observó una alta contaminación por bacterias y levaduras. A este respecto, los resultados indican que esta contaminación puede provenir del propio papel en donde se encontraba el esclerocio inicial.

5. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo, tal y como se pueden ver en la **Tabla 2**, son las siguientes:

- 1- Los medios propuestos en este trabajo dan buenos resultados a excepción del medio MMA
- 2- De los medios propuestos, el medio MAC es el que mejor resultados proporciona ya que es en este dónde el organismo sobrevive por más tiempo, además que el crecimiento lo realiza extendiéndose más por la placa
- 3- Gracias a la capacidad del plasmodio de sobrevivir tanto tiempo si tiene fuente de alimento disponible, se pueden sembrar nuevas placas a través de cualquier edad del plasmodio sin que afecte al crecimiento de éste
- 4- Las técnicas utilizadas para la observación de la actividad metabólica no dieron resultados salvo la medición de la velocidad del crecimiento, pero esta medida solo era apta para dos medios utilizados (MAC y MMA) no pudiéndose comparar con los demás medios. Sería necesario conseguir otras técnicas que den resultados para poder recopilar datos de una forma más estandarizada y así conseguir una mejor comparación entre las distintas condiciones ensayadas
- 5- El uso de un antifúngico, la nistatina, da muy buenos resultados en relación con proteger al organismo de la contaminación fúngica y que, a la concentración descrita en el apartado anterior, no afecta al crecimiento del organismo
- 6- La temperatura no modifica el crecimiento del plasmodio

Conclusions

This work has the following conclusions, summarized in **Table 2**:

- 1- The media proposed in this work give good results except for the MMA medium
- 2- Of the proposed media, the MAC medium is the one that provides the best results since it is in this medium where the organism survives for the longest time.
- 3- Thanks to the ability of the plasmodia to survive for as long if it has a food source available, new plates can be inoculated using plasmodia fragments of different ages without affecting its growth
- 4- The techniques used for the observation of metabolic activity did not give results except for the measurement of growth speed, although this measurement was only suitable for two of the media used (MAC and MMA). New techniques need to be developed in order to assess growth and vitality in plasmodia.
- 5- The use of an antifungal agent, nystatin, gives very good results in protecting the plasmodium from fungal contamination.
- 6- The two temperatures assayed do not alter the growth of plasmodia

Tabla 2. Resumen de las condiciones, medios y técnicas ensayadas en este trabajo y sus resultados.

Condición	Resultado
Cepas Ava y Charly	Sin diferencias entre ambas
Medios	
MAC	Positivo. Crecimiento extendido y ramificado
MMA	Negativo
MPCC	Positivo. Crecimiento continuo, no ramificado
MPC	Positivo. Crecimiento continuo, no ramificado
Inoculación del esclerocio o trasplante	Sin diferencias entre ambas
Corrientes citoplasmáticas	Negativo
Colorantes vitales	Negativo
Análisis de contaminación	Bacterias y levaduras
Velocidad del crecimiento	Apto para medios MAC y MMA. Mejor resultado MAC
Uso de antifúngico (nistatina)	Positivo a 10 u/ml de concentración
Temperatura	Sin diferencias entre ambas temperaturas
Medio MPH	Positivo. Crecimiento continuo, no ramificado
Matraz inclinado	Positivo. Crecimiento en medio líquido
Microplasmodios	Negativo

6. Bibliografía

Adl MS, Gupta VVSR. 2006. Protists in soil ecology and forest nutrient cycling. *Canadian Journal of Forest Research* 36: 1805-1817

Adler, Paul N., et al. 1975, "Life Cycle Variants of *Physarum Polycephalum* That Lack the Amoeba Stage." *Science*, vol. 190, no. 4209, pp.65–67. JSTOR, www.jstor.org/stable/1740885. Accessed 29 June 2021.

Aldrich, H. and Daniel, J. 1982. *Cell Biology of Physarum and Didymium, Volume II: Differentiation, Metabolism, and Methodology*

Alim K, Andrew N, Pringle A. 2013. *Physarum*. *Current Biology* 23: R1082

Boussard, A., Fessel, A., Oettmeier, C., Briard, L., Döbereiner, H. and Dussutour, A. 2021 Adaptive behaviour and learning in slime moulds: the role of oscillations *Phil. Trans. R. Soc.* **B376**20190757

Clark J, Haskins EF. 2010. Reproductive systems in the Myxomycetes: a review. *Mycosphere* 1:337-353

Cifuentes F, León R & Gómez C. (1993). Efecto de ketoconazole, clotrimazole, nistatina y cicloheximida sobre el crecimiento de *Phaffia rhodozyma*. *Boletín Micológico*. Vol. 8 (1-2) 13-17

Daniel JW, Baldwin HH. 1964. Methods of culture for plasmodial myxomycetes. In Prescott DM (ed.). *Methods in Cell Biology* vol. 1. Academic Press. Nueva York

Dembitsky VM, Rezanka T, Spizek J, Hanus L. 2005. Secondary metabolites of slime molds (myxomycetes). *Phytochemistry* 66: 747-769

Gorman, J.A., Dove, W.F. and Shaibe, E. (1979), Mutations affecting the initiation of plasmodial development in *Physarum polycephalum*. *Dev. Genet.*, 1: 47-60. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020010106>

Hosoda, E. (1981) Sporulation of Oat-Cultured *Physarum Polycephalum*. I. Sporulation Competence of Dark Starved Plasmodia, *Mycologia*, 73:4, 689-696, DOI: 10.1080/00275514.1981.12021396

Howard FL. 1931. The life history of *Physarum polycephalum*. *American Journal of Botany* 18: 116-133

Koevenig JL, Liu EH. 1981. Carboxymethyl Cellulase Activity in the Myxomycete *Physarum polycephalum*. *Mycologia* 73: 1085-1091

Kubbis M, Wick R, Hildebrandt A, Sauer HW. 1986. Flow cytometry reveals a high degree of genomic size variation and mixoploidy in various strains of the acellular slime mold *Physarum polycephalum*. *Cytometry* 7: 481-485

Lia S, Linb N, Wua B. 2020. Laboratory culture and bioactive natural products of myxomycetes. Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316021, China. Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lishui 323000, China

Mayne, R., Adamatzky, A. & Jones, J. (2015) On the role of the plasmodial cytoskeleton in facilitating intelligent behavior in slime mold *Physarum polycephalum*, *Communicative & Integrative Biology*, 8:4, DOI: 10.1080/19420889.2015.1059007

Nakagaki T., Kobayashi R., Nishiura Y. and Ueda T. 2004 Obtaining multiple separate food sources: behavioural intelligence in the *Physarum plasmodium* *Proc. R. Soc. Lond. B*. **271**2305–2310

Nowak, A and Steffan, B. 1998. Polycephalin B and C: Unusual Tetramic Acids from Plasmodia of the Slime Mold *Physarum polycephalum* (Myxomycetes) *Angew Chem Int Ed Engl*. 1998 Dec 4;37(22):3139-3141. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19981204)37:22<3139: AID-ANIE3139>3.0.CO;2-6. PMID: 29711329.

Oettmeier, C., Nakagaki, T. and Döbereiner, H., 2020. Slime mold on the rise: the physics of *Physarum polycephalum*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, Volume 53, Number 31

Rich, P., Mischis, L., Purton, S., Wiskich, J. The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 202, Issue 2, August 2001, Pages 181–187, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10801.x>

Rivera-Toledo E, Jiménez-Delgadillo AU, Manzano-Gayosso P. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Rev Fac Med UNAM* . 2020;63(2):7-17.

Schnittler M, Novozhilov YK, Romeralo M, Brown M, Spiegel FW. 2012. Fruit body-forming protists: Myxomycetes and Myxomycete-like organisms In Frey W (ed.). *Syllabus of Plant Families* vol 1.1. Brontraeger. Stuttgart

Tran H, Stephenson S, Pollock E. 2015. Evaluation of *Physarum polycephalum* plasmodial growth and lipid production using rice bran as a carbon source. *BMC Biotechnology* 15: 67.

Villota, C. (2019). Inhibición de *Cándida Albicans* a partir de aceite esencial de Botoncillo, (*Acmella Repens*) a diferentes concentraciones, comparación con nistatina de 100000 UI. Estudio in Vitro.

Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Odontólogo. Carrera de Odontología. Quito: UCE. 97 p.

Westendorf C, Gruber CJ, Schnitzer K, Kraker S, Grube M. 2018. Quantitative comparison of plasmodial migration and oscillatory properties across different slime molds. *Journal of Physics D: Applied Physics* 51: 34

Wet, P.M., Rode, H., van Dyk, A. and Millar, A.J.W. (1999), Perianal candidosis—a comparative study with mupirocin and nystatin. *International Journal of Dermatology*, 38: 618-622. <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.1999.00757.x>