

Note introduttive allo studio dei Mixomiceti e prima segnalazione di *Physarum columellatum* in Italia

(English version on page 8)

D. Signorini¹

¹Via Belvedere 12, I-37023 Romagnano (VR), Italia; danilosignorini65@gmail.com

Parole chiave:
mixomiceti
Physarum columellatum

Riassunto: Viene documentato, con fotografie degli sporocarpi e dei principali caratteri microscopici, il primo ritrovamento di *Physarum columellatum* in Italia, raccolto nel paese di Grezzana, a nord della provincia di Verona, in bosco misto di latifoglie con *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* e *Ailanthus altissima*. Vengono anche fornite note introduttive generali allo studio dei myxomiceti accompagnate da varie immagini didascaliche; viene descritto il loro ciclo vitale e vengono dati dei suggerimenti sulle tecniche di raccolta e di conservazione e sull'utilizzo di uno stereomicroscopio per l'osservazione di alcuni caratteri particolari.

INTRODUZIONE

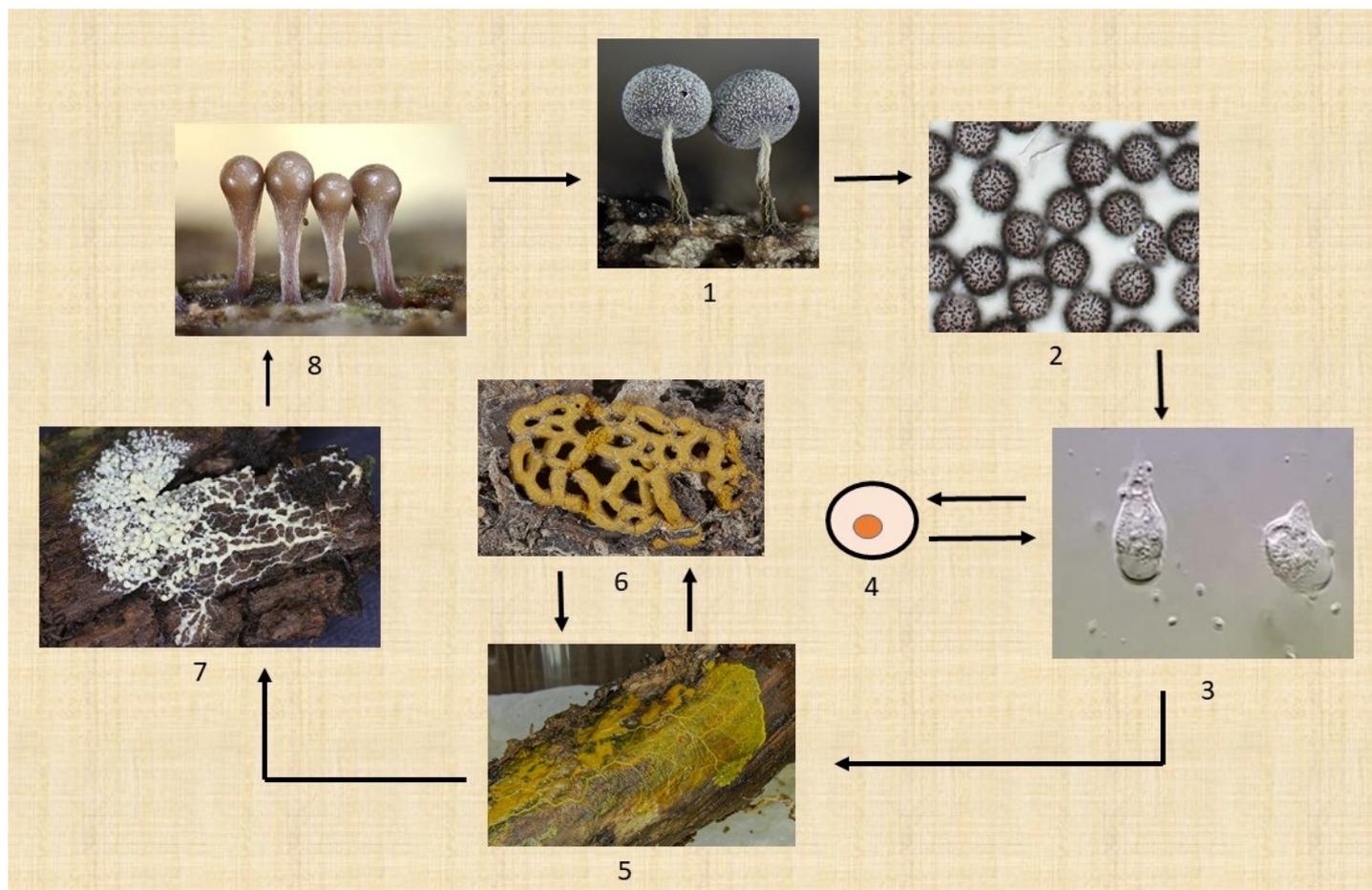


Fig. 1 – Ciclo di vita / life cycle

Note generali sul ciclo di vita dei Mixomiceti. I Mixomiceti sono organismi che presentano un eccezionale interesse sia dal punto di vista biologico che tassonomico. Essi infatti costituiscono un materiale ideale per lo studio in laboratorio di alcuni processi biologici di fondamentale importanza quali possono essere la divisione nucleare, la sintesi del DNA, la morfogenesi, le correnti protoplasmatiche, ecc.

Per quanto riguarda poi la loro posizione sistematica, la questione è tutt'altro che risolta: anche se vengono generalmente considerati affini ai funghi, vi sono tuttavia ancora oggi studiosi che li ritengono più prossimi agli animali e li collocano tra i Protozoi (Micetozoi).

Ciò deriva dal fatto che il singolare ciclo vitale di questi organismi (Fig. 1) presenta due fasi ben distinte: la prima, con caratteristiche di tipo animale, è vegetativa ed è costituita dal plasmodio che inizia con la germinazione delle spore (Fig. 1.3) e arriva fino alla fase rappresentata in Fig. 1.5; la seconda, con caratteristiche di tipo vegetale, è riproduttiva, inizia dalle Fig. 1.7-1.8 e finisce con la maturazione dello sporoforo o sporocarpo (Fig. 1.1) e la liberazione delle spore (Fig. 1.2).

Le Fig. 1.4 e 1.6 rappresentano una opzione comportamentale molto interessante di questi organismi. Essi, infatti, sia nella fase di protozoo (Fig. 1.4) che in quella di plasmodio (Fig. 1.6), in presenza di forti sbalzi atmosferici dall'umido al secco, possono attivare un meccanismo difensivo consistente nell'irrigidire la parete esterna (incistamento) che gli consente di trattenere l'umidità al loro

interno; in questo modo hanno la possibilità di sopravvivere e aspettare che sopraggiunga una condizione favorevole di umidità, per esempio la rugiada notturna.

Il plasmodio è una massa di protoplasma multinucleata, acellulare, capace di spostarsi liberamente sul substrato per mezzo di movimenti ameboidi e di alimentarsi inglobando batteri, particelle organiche, spore e micelio di funghi, ecc. Quando si verificano condizioni ambientali adatte alla riproduzione, il plasmodio si fissa al substrato e si organizza in uno o più sporofori destinati alla produzione delle spore. In molte specie il plasmodio passa la maggior parte della vita immerso nel substrato (legno morto, lettiera, sterco, ecc.) risalendo alla superficie soltanto al momento della fruttificazione (Fig. 2), per poi dividersi in singoli sporocarpi (Fig. 3).



Fig. 2 – Plasmodio / plasmodium

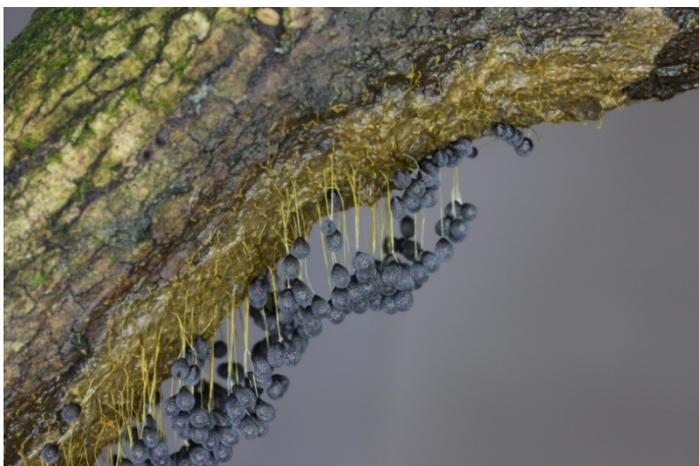


Fig. 3 – *Physarum utricolare*. Sporocarpi / sporocarps

I Mixomiceti vivono in genere su legno morto o marcescente, foglie morte, paglia e detriti vegetali di varia natura; talune specie crescono anche sui fusti e sulle foglie di piante vive, ma i danni arrecati sono sempre modesti e non si può mai parlare di veri e propri casi di parassitismo. Se pur crescendo, dunque, la maggior parte dei Mixomiceti su materia organica morta, non risulta tuttavia che essi svolgano alcun ruolo nei processi di decomposizione in natura; probabilmente la loro associazione con i substrati organici in via di disfacimento è soltanto dovuta al singolare modo di nutrizione dei loro plasmodi. Essi si rinvencono praticamente in tutti i tipi di ambiente, dai boschi, dove abbondano sui tronchi e i rami caduti, sulle ceppaie e nella lettiera, ai campi aperti, dalla pianura alla montagna, dove vivono anche ai margini delle macchie di neve in fusione. Hanno una distribuzione geografica piuttosto vasta e moltissime specie sono cosmopolite. Nel Nord Italia la comparsa degli sporofori è in genere legata all'andamento stagionale: i periodi in cui è più facile trovarli vanno dalla primavera inoltrata all'inizio estate e soprattutto l'autunno.

Molte specie però sfuggono facilmente all'osservazione in natura a causa delle esigue dimensioni delle loro fruttificazioni, spesso inferiori a 1 mm; per ovviare a questo inconveniente è stata messa a punto, ormai da parecchi anni, una tecnica di coltura molto semplice, detta della «camera umida». Questa consiste nel porre in capsule Petri su carta da filtro imbevuta di acqua il materiale da coltivare, composto da frammenti di cortecce, foglie morte e altri detriti vegetali prelevati in natura; mantenendo le giuste condizioni di temperatura e di umidità nelle capsule potranno comparire nel giro di pochi giorni plasmodi e sporofori di diverse specie. La determinazione dei Mixomiceti si basa essenzialmente sulle caratteristiche macromorfologiche e microscopiche (soprattutto esame delle spore e del capillizio) degli sporocarpi. Dal punto di vista tassonomico la classe dei *Myxomycetes* G. Winter viene suddivisa in due sottoclassi: *Ceratiomyxomycetidae* G.W. Martin, a cui appartengono pochissime specie caratterizzate dall'aver spore che si formano all'esterno dello sporoforo (esosporee) e *Myxogastromycetidae* G.W. Martin, che comprendono la grande maggioranza delle specie con spore che si formano all'interno dello sporoforo (endosporee).

Le Fig. 4 e 5 mostrano alcune delle specie più rappresentative di alcuni generi e le loro dimensioni.



Fig. 4

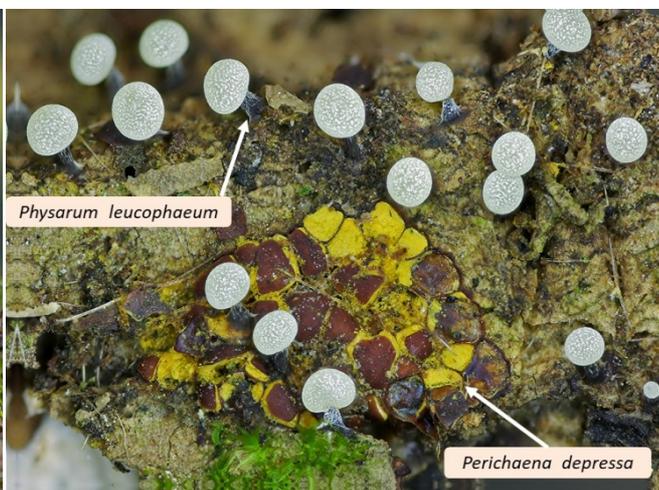


Fig. 5

Molte specie sono abbastanza facili da determinare, per la dimensione (p. es. *Fuligo septica*), ma la maggior parte ha dimensioni così ridotte che anche con una lente tascabile 30x non si riesce a determinarle; in questo caso si ricorre allo stereomicroscopio: è sufficiente un ingrandimento da 20x a 40x in modo da sezionare lo sporocarpio e controllare, per esempio, se all'interno c'è una parte dello sporocarpio, detta columella, che è un prolungamento del gambo all'interno della sporociste (Fig. 6).

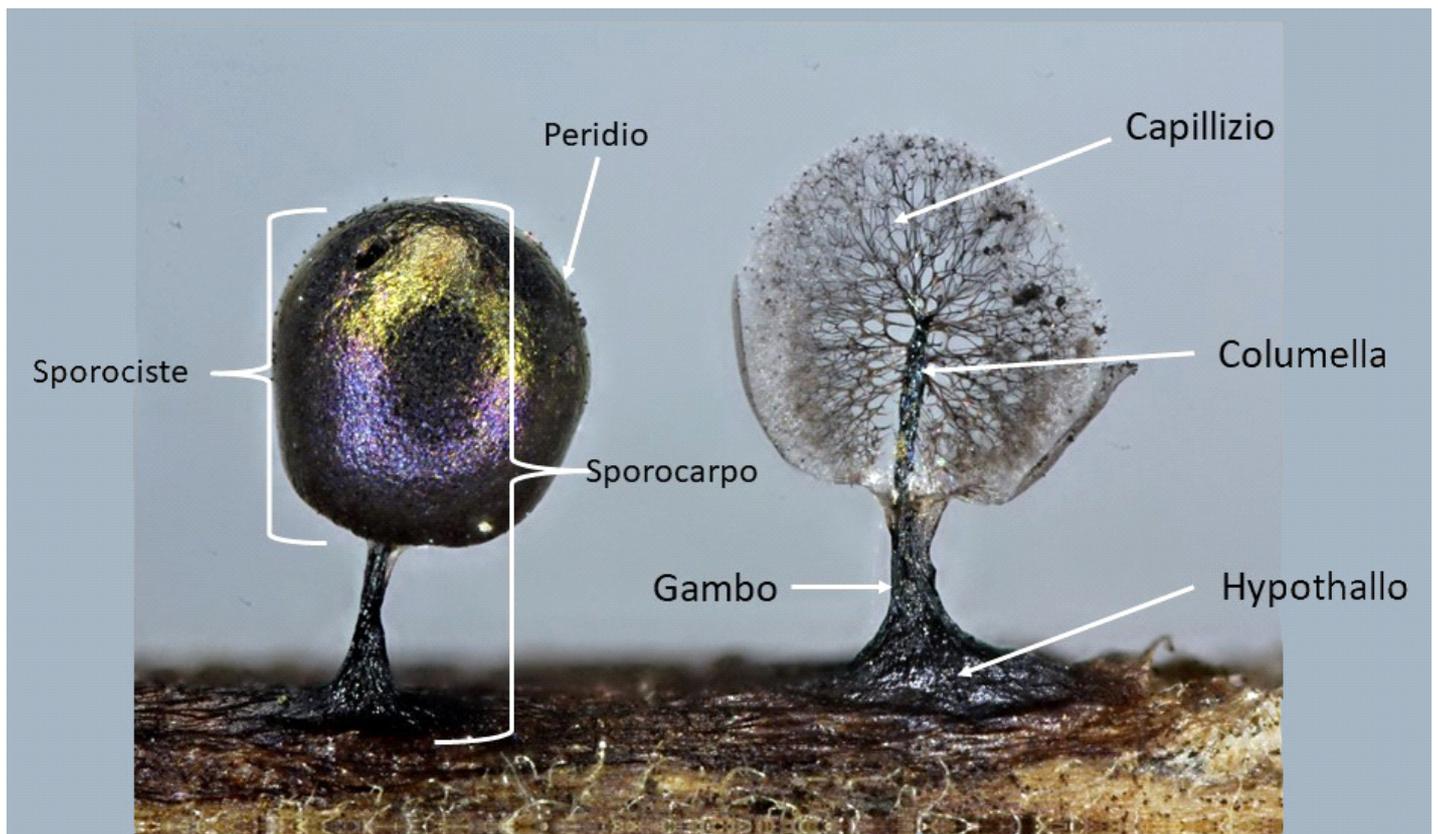


Fig. 6 – Parti interne ed esterne dello sporocarpio / internal and external parts of the sporocarp

Finora sono stati catalogati circa 60 generi, di cui la maggior parte è stata trovata in Europa, ma si possono rinvenire specie esotiche o di altri continenti, ed è il caso del *Physarum columellatum* descritto dal Giappone ma segnalato anche in alcuni paesi Europei. Il mio unico ritrovamento è avvenuto nel luglio 2019, su un ramo di un tronco morto di *Ailanthus altissima* ricoperto di muschio e giacente a ca. 1.5 m. di altezza dal piano del terreno. Il genere *Physarum* è tra i più numerosi, di conseguenza molte specie si assomigliano e senza l'uso del microscopio e dello stereomicroscopio è molto difficile, se non impossibile, determinarle a causa delle loro piccole dimensioni; inoltre è facile confonderle macroscopicamente con specie di altri generi, come si può vedere dal confronto in Fig. 7. Data la loro fragilità, per il trasporto verso il luogo di studio bisogna adottare dei raccoglitori appositi dove i campioni da esaminare siano bloccati da spilli per evitare che si distruggano, come si vede nella Fig. 8; è utile usare contenitori multi comparto con del polistirolo posto sul fondo.



Fig. 7 – *Physarum columellatum*; *Didymium melanospermum*



Fig. 8 – Raccoglitore dei campioni / sample container

Una volta portati nel luogo di studio, bisogna avere l'accortezza di fare un primo esame per valutare se è avvenuta la completa maturazione; lo notiamo se le spore volano via facilmente provando a soffiare con una cannucchia sugli sporocarpi, in caso contrario bisogna metterli in una scatola di plastica parzialmente chiusa (camera umida) con un pezzo di carta assorbente inumidito con acqua sul fondo. Si attenderà due o più giorni per la maturazione, sperando che la muffa non invada e inquina il campione; successivamente si procede all'esame di una sezione con lo stereomicroscopio. Nel caso della raccolta in oggetto, tramite questo esame è stata immediatamente notata la presenza di una columella particolare, di una forma poco comune per il genere *Physarum*, e caratteristica di *P. columellatum*.

Come ultimo passo, i campioni vengono essiccati all'aria e conservati in piccole scatole di cartoncino etichettate con i dati della raccolta.

MATERIALI E METODI

La raccolta è stata effettuata con un coltello per asportare una parte della corteccia assieme al substrato mucoso, disponendo i campioni in scatola multi scomparto e fermandoli per mezzo di spilli per il trasporto fino al luogo di studio. Per fotografarli è stato usato il metodo "focus stacking" per aumentare la profondità di campo. Le foto sono state eseguite con una macchina fotografica Canon 60D e un obiettivo Canon MP-E 65mm, il tutto montato su una slitta micrometrica; infine è stato usato il programma CombineZP per la combinazione delle foto in multistacking (focus stacking).

Tutti i microcaratteri sono stati studiati e fotografati su materiale secco rigonfiato con KOH al 3 % attraverso l'utilizzo di un microscopio ottico a luce trasmessa.

TASSONOMIA



Physarum columellatum. 15/06/2019 Grezzana (VR)

Physarum columellatum Nann.-Bremek. & Y. Yamam., *Proc. K. Ned. Akad. Wet., Ser. C, Biol. Med. Sci.* **90**(3): 327. 1987

= *Physarum crateriforme* var. *columellatum* (Nann.-Bremek. & Y. Yamam.) D.W. Mitch., in McHugh, Stephenson, Mitchell & Brims, *New Zealand Journal of Botany* **41**(3): 495. 2003.

Regno: *Protozoa* R. Owen

Divisione: *Myxomycota* Whittaker

Classe: *Myxomycetes* G. Winter

Ordine: *Physarales* T. Macbr.

Famiglia: *Physaraceae* Chevall.



Physarum columellatum. 15/06/2019 Grezzana (VR)

Caratteri macroscopici

Sporociste: singola, subglobosa, diam. 0.4-0.6 mm, costituita da una membrana di rivestimento esterno, peridio, e internamente da una columella e un capillizio.

Peridio: in chiazze grossolane di colore bianco calcareo, con base brunastra.

Columella: di forma allungata, brunastra alla base e schiarentesi verso l'apice dove si congiunge con il peridio.

Capillizio: si diparte dalla columella e si irradia verso il peridio con ife ialine e con globuli informi e grossolani.

Gambo: corto, tozzo, solcato per tutta la lunghezza, nerastro.

Ipotallo: poco visibile alla base del gambo.

Plasmodio: sconosciuto.

Caratteri microscopici

Spore: globose, finemente verrucose, brunastre, 8 – 10 μm .

Peridio: composto da granuli di calcare bianco larghi 1 – 2 μm .

Capillizio: di ife ialine con globuli bianchi, formati da granuli di calcare larghi 1 – 2 μm .

Habitat: in singoli esemplari su muschio del genere *Amblystegium serpens* su un terreno con molti resti di legno a vari livelli di degrado, dal legno marcescente alla pianta vivente, in bosco misto di latifoglie con *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* e *Ailanthus altissima*, substrato con pH 7.

Raccolta studiata: Italia, Verona, Grezzana, 45°31'25.0"N 11°01'35.0"E, 15/06/2019, D. Signorini, VER fu1.

COMMENTI

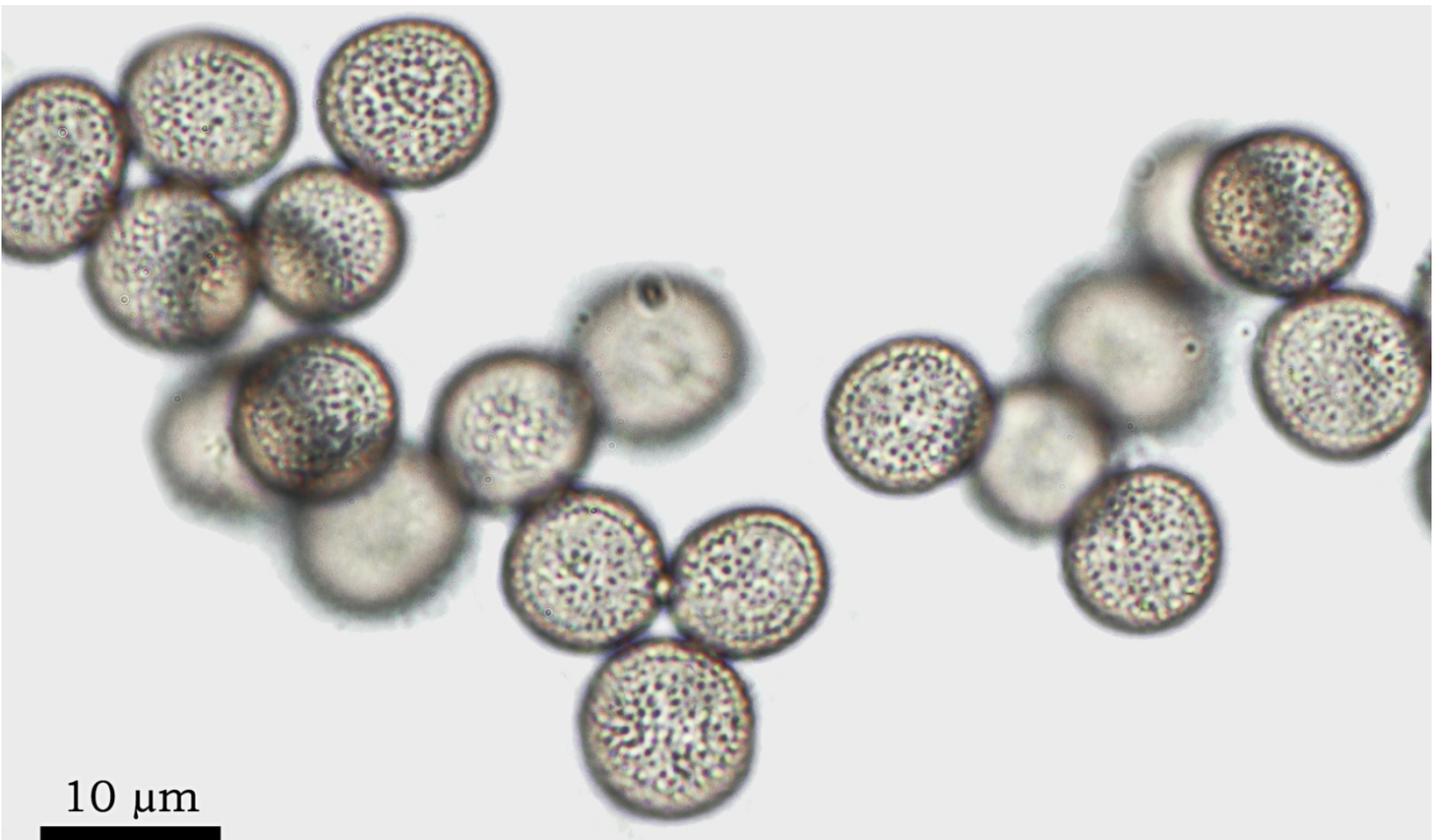
Come riferimenti bibliografici, per la determinazione di questa raccolta, sono stati usati la pubblicazione originale di *P. columellatum* in Nannenga-Bremekamp & Yamamoto (1987) e le monografie di Poulaine, Meyer & Bozonnet (2011) e di Neubert, Nowotny & Baumann (1995).

P. columellatum si può confondere macroscopicamente con alcune specie di altri generi aventi il gambo nerastro, p. es. *Didymium melanospermum* (Pers.) T. Macbr. che, tuttavia, con un'attenta analisi allo stereomicroscopio, si distingue agevolmente per la mancanza di globuli bianchi attaccati al capillizio. Nel genere *Physarum* può essere confrontata, in particolare, con *P. notabile* T. Macbr. che è privo di columella, e con *P. pseudocolumellatum* nom. prov. (Poulain, Meyer & Bozonnet, 2011) che ha invece una columella corta e arrotondata.

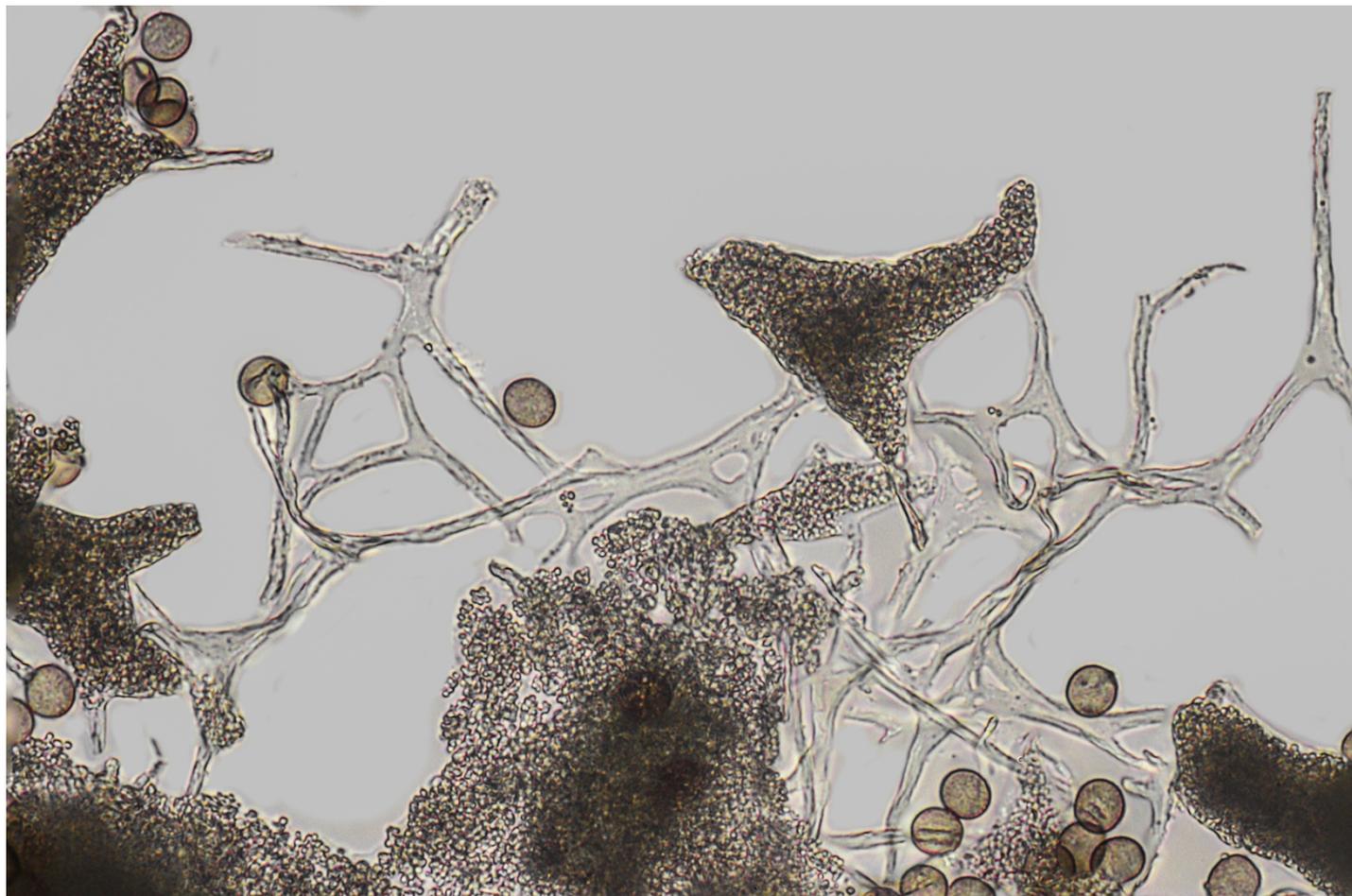
Una citazione a parte merita il confronto con *P. crateriforme* Petch, originaria dello Sri Lanka e anch'essa dotata di columella. Questa specie si distingue per avere i globuli bianchi molto piccoli, il gambo più lungo, e le spore più grandi [(9) 10 – 11 (12) μm]; per questi motivi viene qui rigettata la sinonimia proposta da Kryvomaz, Minter & Minchaud (2017).



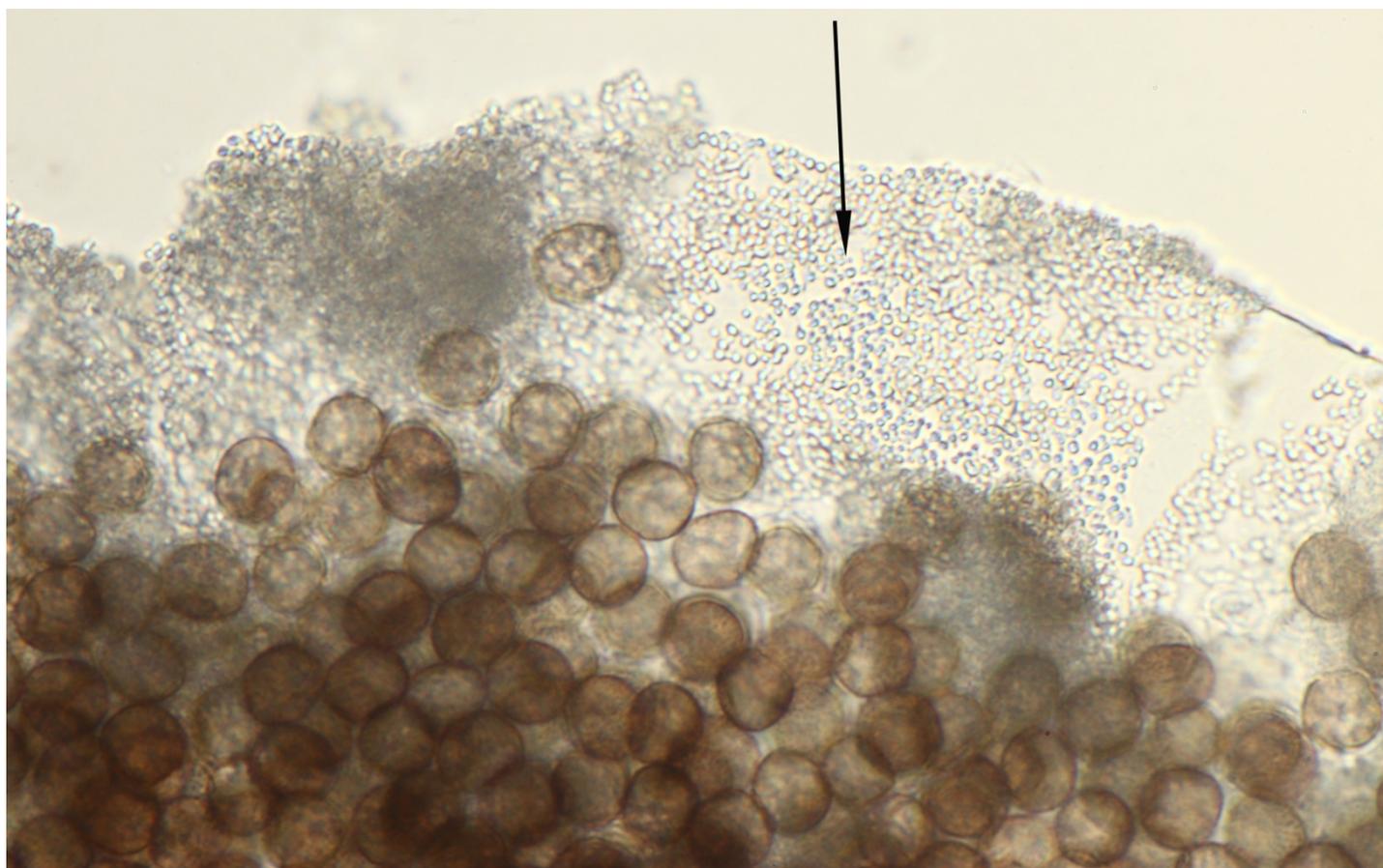
Physarum columellatum. Capillizio e columella / capillitium and columella



Physarum columellatum. Spore in KOH 3% / spores in 3% KOH



Physarum columellatum. Capillizio in KOH 3% / Capillitium in 3% KOH



Physarum columellatum. Peridio / Peridium

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

- Kryvomaz T.I., Minter D.W., Minchaud A. (2017). Myxomycetes (*Physarum*). IMI. *Descriptions of Fungi and Bacteria* **212** (2111-2120). Nannenga-Bremekamp NE, Yamamoto Y (1987). Additions to the Myxomycetes of Japan III. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Series C, Biological and Medical Sciences* **90**(3): 311-349.
- Neubert H, Nowotny W, Baumann K (1995). Die Myxomycetes Deutschlands und des angrenzenden Alpenraumes unter besonderer Berücksichtigung Österreichs, 2. *Physarales* **2**: 1-368.
- Poulain M, Meyer M, Bozonnet J (2011). Les Myxomycètes. FMBD, Savoie, Sevrier, France. DOI:10.13140/RG.2.1.4071.2562

Introductory notes to the study of the Myxomycetes and first report of *Physarum columellatum* in Italy

Key words:

myxomycetes

Physarum columellatum

Abstract : The first finding of *Physarum columellatum* in Italy is documented with photographs of the sporocarps and of the main microscopic characters; it was collected in the town of Grezzana, north of the province of Verona, in a mixed deciduous wood with *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* and *Ailanthus altissima*. General introductory notes to the study of Myxomycetes are also provided accompanied by various didactic images; their life cycle is described and suggestions are given on collection and storage techniques and on the use of a stereomicroscope for the observation of some particular characters.

INTRODUCTION

General notes to the life cycle of Myxomycetes. Myxomycetes are organisms of exceptional biological and taxonomic interest. In fact, they constitute an ideal material for the laboratory study of some biological processes of fundamental importance such as nuclear division, DNA synthesis, morphogenesis, protoplasmic currents, etc.

As for their systematic position, the question is far from resolved: even if they are generally considered similar to mushrooms, there are still today scholars who consider them closer to animals and place them among the Protozoa (Mycetozoa).

This derives from the fact that the singular life cycle of these organisms (Fig. 1) has two distinct phases: the first, with animal-like characteristics, is vegetative and consists of the plasmodium beginning with the germination of the spores (Fig. 1.3) and reaching the phase represented in Fig. 1.11; the second, with vegetal characteristics, is reproductive, it starts from Fig. 1.13-1.14 and ends with the maturation of the sporophore, also called sporocarp, (Fig. 1.1) and with the release of the spores (Fig. 1.2).

Fig. 1.6 and 1.12 represent a very interesting behavioral option of these organisms. In fact, both in the protozoan phase (Fig.1.6) and in the plasmodium phase (Fig.1.12), when in the presence of strong atmospheric changes from wet to dry, they can activate a defensive mechanism consisting in stiffening the external wall (encystment) which allows them to retain moisture inside; in this way they have the possibility to survive and wait for a favorable condition of humidity to arrive, for example the night dew.

The plasmodium is a multinucleated mass of protoplasm, acellular, able to move freely on the substrate by means of amoeboid movements and to feed by incorporating bacteria, organic particles, spores and mycelia of fungi, etc. When environmental conditions suitable for reproduction occur, the plasmodium attaches to the substrate and organizes itself in one or more sporophores intended for the production of spores. In many species the plasmodium spends most of its life immersed in the substrate (dead wood, litter, dung, etc.), rising to the surface only at the moment of fruiting (Fig. 2), and then dividing into single sporocarps (Fig. 3).

Myxomycetes generally live on dead or rotting wood, dead leaves, straw and vegetable debris of various kinds; some species also grow on the stems and leaves of live plants, but the damage caused is always modest and we can never speak of real cases of parasitism. Therefore, although most of the Myxomycetes grow on dead organic matter, it does not appear that they play any role in the decomposition processes in nature; probably their association with the decaying organic substrates is only due to the singular way of nutrition of their plasmodia. They are found practically in all types of environments, from woods, where they abound on fallen trunks and branches, on stumps and in litter, to open fields, from plains to mountains, where they also live on the edge of melting snow patches. They have a rather vast geographical distribution and many species are cosmopolitan. In Northern Italy the appearance of sporophores is generally linked to the seasonal trend: the periods in which it is easier to find them are late spring to early summer and especially autumn.

However, many species easily escape observation in nature due to the small size of their fruiting, often less than 1 mm; to overcome this drawback, a very simple culture technique, known as the "humid chamber", has been developed since several years now. It consists in placing the material to be cultivated, composed of fragments of bark, dead leaves and other vegetable debris taken from nature, in Petri dishes on filter paper soaked in water; by maintaining the right conditions of temperature and humidity in the capsules plasmodia and sporophores of different species may appear within a few days. The determination of Myxomycetes is essentially based on the macromorphological and microscopic characteristics (especially examination of the spores and of the capillice) of the sporocarps. From the taxonomic point of view, the class of *Myxomycetes* G. Winter is divided into two subclasses: *Ceratiomyxomycetidae* G.W. Martin, to which very few species belong characterized by producing the spores outside the sporophore (exosporic) and *Myxogastromycetidae* G.W. Martin, which include the vast majority of species with spores produced inside the sporophore (endosporic).

Fig. 4 and 5 show some of the most representative species of some genera and their dimensions.

Many species are fairly easy to determine due to their size (eg. *Fuligo septica*), but most are so small that even with a 30x pocket loupe it is not possible to determine them; in this case the stereomicroscope is used: it is sufficient a 20x to 40x

magnification so as to dissect the sporocarp and check, for example, if there is a part of the sporocarp inside, called columella, which is an extension of the stalk within the sporocyst (Fig. 6).

Up to now about 60 genera have been cataloged, most of which have been found in Europe, but exotic species or species from other continents can be found, and this is the case of *Physarum columellatum*, described by Japan but also reported in some European countries. My only find occurred in July 2019, on a branch of a dead trunk of *Ailanthus altissima* covered with moss and lying at approx. 1.5 m. above the ground level. The genus *Physarum* is among the most numerous, consequently many species resemble each other and without the use of the microscope and stereomicroscope it is very difficult, if not impossible, to determine them, due to their small size; moreover it is easy to confuse them macroscopically with species of other genera, as can be seen from the comparison in Fig. 7. Because of their fragility, for the transport to the place of study it is necessary to adopt special containers where the samples to be examined are blocked by pins to prevent them from being destroyed, as shown in Fig. 8; it is useful to use multi-compartment containers with polystyrene placed on the bottom.

Once brought to the place of study, it is necessary to be careful to do a first examination to evaluate if the complete maturation has occurred; this can easily be noticed if a spore cloud flies away when trying to blow with a straw on the sporocarps, otherwise they must be put in a partially closed plastic box (humid chamber) with a piece of paper towel moistened with water at the bottom. Two or more days will be waited for maturation, hoping that the mold does not invade and pollute the sample; subsequently, a section is examined with the stereomicroscope. In the case of the collection in question, through this examination the presence was immediately noticed of a particular columella of an uncommon form for the genus *Physarum* and characteristic of *P. columellatum*.

As a last step, the samples are air-dried and stored in small cardboard boxes labeled with the collection data.

MATERIALS AND METHODS

The samples were collected with a knife to remove a part of the bark together with the mossy substrate and then they were placed in a multi-compartment box and stopped with pins for transportation to the study site. To photograph them the "focus stacking" method was used to increase the depth of field. The pictures were taken with a Canon 60D camera and a Canon MP-E 65mm lens, all mounted on a macro focusing rail; finally they were focus stacked with the CombineZP software.

All microcharacters were studied and photographed on dry material imbibed with 3% KOH through the use of a transmitted light optical microscope.

TAXONOMY

Physarum columellatum Nann.-Bremek. & Y. Yamam., *Proc. K. Ned. Akad. Wet., Ser. C, Biol. Med. Sci.* **90**(3): 327. 1987

= *Physarum crateriforme* var. *columellatum* (Nann.-Bremek. & Y. Yamam.) D.W. Mitch., in McHugh, Stephenson, Mitchell & Brims, *New Zealand Journal of Botany* **41**(3): 495. 2003

Kingdom: *Protozoa* R. Owen

Division: *Myxomycota* Whittaker

Class: *Myxomycetes* G. Winter

Order: *Physarales* T. Macbr.

Family: *Physaraceae* Chevall.

Macroscopic characters

Sporocyst: single, subglobose, 0.4-0.6 mm across, consisting of an external covering membrane, peridium, and internally of a columella and a capillitium.

Peridium: in coarse limestone-white patches, with a brownish base.

Columella: elongated, brownish at the base and lightening towards the apex where it joins the peridium.

Capillitium: departs from the columella and radiates towards the peridium with hyaline hyphae and with shapeless and coarse globules.

Stalk: short, stocky, furrowed along the entire length, blackish.

Hypothallus: little visible at the base of the stalk.

Plasmodio: unknown.

Microscopic characters

Spores: globose, finely verrucose, brownish, 8 – 10 µm across.

Capillitium: of hyaline hyphae with white globules, formed by limestone granules 1 – 2 µm broad.

Peridium: composed of limestone-white granules 1 – 2 µm broad.

Habitat: in single specimens on moss of the genus *Amblystegium serpens*, on a soil with many wood remains at various levels of decay, from rotting wood to living plant, in mixed deciduous wood with *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* and *Ailanthus altissima*, substrate with pH 7.

Material examined: Italy, Verona, Grezzana, 45°31'25.0"N 11°01'35.0"E, 15/06/2019, D. Signorini, VER fu1.

NOTES

The original publication of *P. columellatum* in Nannenga-Bremekamp & Yamamoto (1987) and the monographs by Poulaine, Meyer & Bozonnet (2011) and Neubert, Nowotny & Baumann (1995) were used as references for the determination of this collection.

P. columellatum can be macroscopically confused with some species of other genera having a blackish stalk, for example *Didymium melanospermum* (Pers.) T. Macbr. which, however, is easily distinguished by a careful analysis by a stereomicroscope for lacking white globules attached to the capillitium. In the genus *Physarum* it can be compared, in particular, with *P. notabile* T. Macbr. which is devoid of columella, and with *P. pseudocolumellatum* nom. prov. (Poulain, Meyer & Bozonnet, 2011) possessing also a columella which however is short and rounded.

A separate mention deserves a comparison with *P. crateriforme* Petch, originally from Sri Lanka and also possessing a columella. This species is distinguished by having very small white globules, a longer stalk, and larger spores [(9) 10 – 11 (12) μm]; for these reasons the synonymy proposed by Kryvomaz, Minter & Minchaud (2017) is here rejected.