

ESSAI DE DOMESTICATION DE LENTINUS SQUARROSULUS MONT. A PARTIR D'UNE SOUCHE DU GABON

H. C. EYI NDONG^{1*}, C. NTOUTOUME¹, S. COGNET²

¹Institut de Recherches Agronomiques et Forestières (IRAF), BP 2246 Libreville, Gabon

²Haute Ecole horticole Charlemagne, Rue Verlaine 9, 5030 Gembloux, Belgique

*Corresponding author : BP 2246 Libreville, Gabon ; hugueseyi@yahoo.fr; tel. +241066627118/077798078

RESUME

Dans le cadre d'un vaste programme de valorisation des ressources biologiques initié par les autorités gabonaises en vue de garantir la sécurité alimentaire des populations locales, une souche sauvage de *Lentinus squarrosulus* récoltée au nord du Gabon, a été mise en culture en utilisant essentiellement des matériaux locaux. Au cours de ce processus, cinq principales étapes ont été mise en œuvre; il s'agit notamment de la production du blanc de semis et du substrat de culture, du lardage du substrat, de l'incubation et de la fructification du champignon. La production du blanc regroupe les étapes qui ont obligatoirement été exécutées dans un laboratoire parfaitement équipé en vue de garantir des conditions d'asepsie rigoureuses, tandis que la production du substrat de culture, l'inoculation et l'incubation ont parfaitement été réalisées à l'échelle villageoise en utilisant du matériel de fabrication traditionnelle; notamment une unité de pasteurisation constituée d'un fût en aluminium de 250 litres muni d'étagères et d'une chambre contenant de l'eau, ainsi qu'une armoire traditionnelle d'inoculation. Par ce processus, quatre-vingt sacs de 1kg ont été inoculés dont quatorze ont montré un très bon envahissement mycélien et une fructification satisfaisante; ce qui donne un rendement en terme de sac d'environ 17 %. Cependant, cinquante-six sacs n'ont pas été bien envahis par le mycélium et n'ont donc pas donné de champignon, de plus dix sacs ont été contaminés.

Mots clés : domestication, souche sauvage, *Lentinus squarrosulus*, matériaux locaux, Gabon

ABSTRACT

DOMESTICATION TEST OF LENTINUS SQUARROSULUS MONT. FROM A GABON STRAIN

As part of a vast program to develop biological resources initiated by the Gabonese authorities with a view to guaranteeing food security for local populations, a wild strain of Lentinus squarrosulus harvested in northern Gabon was cultivated using mainly local materials. During this process, five main steps were implemented; these include the production of seedling white and growing medium, larding of the substrate, incubation and fruiting of the fungus. The production of the blank includes the steps which must have been carried out in a perfectly equipped laboratory in order to guarantee rigorous aseptic conditions, while the production of the culture substrate, inoculation and incubation have been perfectly carried out at village scale using traditional manufacturing equipment; including a pasteurization unit consisting of a 250-liter aluminum drum with shelves and a chamber containing water, as well as a traditional inoculation cabinet. By this method, eighty bags (1kg) were inoculated, fourteen of which showed very good mycelial invasion and satisfactory fruiting; which gives a yield of around 17%. However, fifty-six bags were not well invaded by the mycelium and therefore did not give a fungus, and ten bags were contaminated.

Keywords: domestication, wild strain, *Lentinus squarrosulus*, local materials, Gabon

INTRODUCTION

Les populations rurales du Gabon, et plus spécialement les Pygmées, se nourrissent principalement de produits de cueillette, de ramassage et de chasse (Eyi Ndong, 2009), avec un attrait particulier pour les champignons comestibles dont la valeur alimentaire est importante (Degreef *et al.*, 1997). La saisonnalité, la périssabilité, et la difficulté de conserver les champignons récoltés par ces derniers pendant la saison des pluies, du fait entre autres de la difficulté de les sécher au soleil, constituent des obstacles majeurs à l'exploitation efficiente de leurs potentialités socio-économiques et obligent ces populations à consommer la totalité de leur récolte journalière en période de fructification abondante. *Lentinus squarrosulus* est une espèce de champignons saprotrophe, paléotropicale de la famille des Polyporaceae poussant sur le bois mort et fréquente dans presque tous les écosystèmes boisés d'Afrique tropical et d'Asie (Pegler, 1983). Cette espèce fait partie des champignons les plus consommées en Afrique tropicale (Eyi Ndong *et al.*, 2011, Nwanze *et al.*, 2006).

S'agissant de ses potentialités thérapeutiques, *Lentinus squarrosulus* est riche entre autres en saponosides, en alcaloïdes et en polyphénols totaux (Orango Bourdette, 2017); ce qui lui confère des propriétés antioxydantes, antial-

lergiques, anesthésiques, analgésiques, anticancéreuses, anti-bactériennes, anti-plasmodiales et anti-inflammatoires (Casano *et al.*, 2010; Karou *et al.*, 2007, Bruneton, 2009). L'importance de ce champignon en alimentation et en médecine traditionnelle est avérée au nord du Gabon (Eyi Ndong *et al.*, 2020). Sa disponibilité dépend cependant des variations de saisons. Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des champignons locaux de l'Afrique tropicale et du Gabon en particulier. Il vise à contribuer à la sécurité alimentaire et sanitaire par la conception des méthodes de culture des souches locales applicables à l'échelle rurale; et notamment la méthode de culture d'une souche locale de *Lentinus squarrosulus*, en vue d'en garantir la disponibilité tout au long de l'année.

MATERIEL ET METHODES

OBTENTION DE LA SOUCHE SAUVAGE

La souche de *Lentinus squarrosulus* utilisée (figure 1) a été récoltée à l'état jeune sur du bois mort en forêt dense humide dans la station de recherche d'Ipassa au nord-est du Gabon; échantillon d'herbier n° HE 208. Ses caractéristiques macroscopiques et microscopiques étaient conformes à la description faite par Eyi Ndong *et al.* (2011).



Figure 1 : souche de *Lentinus squarrosulus* utilisée poussant sur du bois mort.

Strain of Lentinus squarrosulus used growing on dead wood.

PRODUCTION DE LA CULTURE PURE DU MYCELIUM SUR MILIEU GELOSE

Après la récolte, les très jeunes fructifications dont les lamelles n'étaient pas encore visibles (fig. 1) ont été sélectionnées et bien nettoyées. Sous une hotte à flux laminaire et dans de strictes conditions d'asepsie, de petits morceaux

de la chair du chapeau ont été prélevés en utilisant du scalpel (flambé avec de l'alcool et refroidi) et mise en culture dans le milieu gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA : *Potato Dextrose Agar*) préalablement coulé dans une boîte de Pétri ou dans un tube (fig. 2) suivant Dibaluka & Muambi (1992). Les boîtes et les tubesensemencés ont ensuite été incubés à

l'étuve à 25 °C pendant 4 jours.



Figure 2 : introduction de morceau d'un jeune champignon dans une boîte de Pétri (a) et dans un tube (b).

Introduction of context from a young fungus into a petri (a) dish and into a tube (b).

PRODUCTION DU BLANC DE SEMIS

Le blanc de semis qui a été fabriqué à partir de la culture pure de mycélium est le support mycélien utilisé comme semence du champignon pour ensemercer le substrat de fructification. Sa composition pour 5 kg était de 4500 g de grains de froment (90 %), 25 g de craie (CaCO_3) (0,5 %), 100 g de gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (2 %) et 375 g de vermiculite (7,5 %).

Les grains de froment ont été trempés dans l'eau du robinet pendant 2 heures puis égouttés. Ils ont été cuits dans l'eau bouillante pendant 10 à 15 minutes puis égouttés de nouveau. Après cuisson et égouttage, des additifs y ont été ajoutés suivant les proportions indiquées plus haut tout en veillant à ajuster le pH à 7 puis homogénéiser le mélange.

Les bocaux et les pots ont ensuite été remplis avec 500 gr de substrat, puis stérilisés dans un autoclave pendant 1 heure à 121 °C. Ces récipients ont été secoués en les sortant de l'autoclave afin d'éviter que les graines ne se collent. Après refroidissement autour de 25 °C, les récipients ont été inoculés sous conditions aseptiques en utilisant des carrés de 5 mm² d'agar portant de la cultures pures de mycélium. Après inoculation, les récipients ont été incubés à l'obscurité entre 20 °C et 25 °C pendant deux semaines. Au cours de cette période d'incubation, les récipients ont été remués tous les 3 ou 4 jours.

PRODUCTION DE FRUCTIFICATIONS

PREPARATION DU SUBSTRAT DE CULTURE

Plusieurs substrats pouvaient être utilisés, mais étant donné que la souche de *Lentinus squarrosulus* domestiquée poussait sur le bois mort, nous avons choisi la sciure de bois comme substrat de culture pour la production des fructifications. Cette sciure provenant du bois de l'Ozigo (*Dacryodes buettneri*, Burseraceae) a été trempée dans de l'eau pendant 24 heures, puis essorée de manière à conserver une humidité d'environ 60 %. L'essorage s'est arrêté lorsqu'un fin filet d'eau s'est écoulé entre les doigts. Après avoir pesé et mélangé les composants du substrat (82,5 % de sciure, 15 % de rafles de maïs, 0,5 % de sucre et 2 % de craie CaCO_3), 80 sacs thermorésistants (20 x 30 cm) ont été remplis avec 1kg de substrat. Les sacs ainsi remplis ont été fermés à l'aide d'un tuyau en PVC (5 cm de diamètre, 4 à 5 cm de long) muni d'une bourre de coton. Les bords du sac étant fixés à l'anneau de PVC avec un élastique. Pour éviter que la bourre de coton ne s'humidifie, elle a été recouverte d'un morceau de papier aluminium (fig. 3) ; car une bourre humide gênerait l'aération et faciliterait la contamination.



Figure 3 : substrat de culture ensaché.

Bagged culture substrate.

TRAITEMENT THERMIQUE

L'unité de pasteurisation utilisée était un fût en aluminium de 250 litres muni d'étagères et d'une chambre contenant de l'eau (fig. 4a). Les sacs contenant le substrat ont été recouverts de papier aluminium pour les protéger de l'infiltration des eaux condensées dans l'unité de

pasteurisation. Pour minimiser les contaminations lors du traitement thermique du substrat de culture, la face supérieure du fût a légèrement été perforée pour permettre une bonne circulation de la vapeur ; une circulation insuffisante de chaleur serait en effet une source de contamination du substrat de culture. Le traitement thermique qui a duré 6h a été chronométré dès l'apparition de la vapeur à la face supérieure du fût (fig. 4b).



Figure 4 : traitement thermique du substrat de culture : sacs couverts d'aluminium (a), apparition de la vapeur à la face supérieure du fût (b).

heat treatment of the culture substrate: bags covered with aluminum (a), appearance of steam on the upper side of the barrel (b).

LARDAGE, INCUBATION ET FRUCTIFICATION

Les sacs ont été inoculés le lendemain de la pasteurisation après refroidissement. L'inoculation s'est faite dans une armoire traditionnelle d'inoculation (fig. 5) et le taux d'inoculation était de 3 % (30 g de blanc sur

grains par kilo de substrat). Pour cela, les surfaces en verre du coffre d'inoculation, la mesure en plastique ainsi que la bouteille de blanc ont préalablement été désinfectées à l'alcool à 90°. Le bocal de blanc ouvert, le goulot était passé à la flamme avant le prélèvement de la quantité de blanc nécessaire. Le sac de substrat a été ouvert près de la flamme et la bourre de coton pincé entre les doigts. Le blanc

sur grains a été finalement versé dans le sac puis refermé avec le bouchon de coton. Le mélange a été homogénéisé par malaxage du sac puis les sacs ont été incubés dans l'obscurité pendant six semaines à température ambiante. Une bonne circulation de l'air a été maintenue dans la salle d'incubation grâce aux espaces d'aération entre les murs et le toit. Pour maintenir un taux d'humidité acceptable dans la champignonnière, le sol était arrosé deux à quatre fois par jour. Lorsque les sacs incubés

ont complètement été envahis par le mycélium et que celui-ci a viré au brun en surface, les bouchons ont été retirés afin de permettre l'aération du mycélium. Cette aération a provoqué l'apparition d'une croûte plus ou moins épaisse et la partie supérieure du plastique a été découpée puis les sacs ont été arrosés par pulvérisation d'eau préalablement bouillie et refroidie à température ambiante (Quimio *et al.*, 1990) jusqu'à l'apparition des primordia (petits champignons).



Figure 5 : lardage
Larding

RESULTAT ET DISCUSSION

OBTENTION DU MYCELIUM DE DEPART (OU CULTURE PURE)

En quatre jours à l'étuve (25 °C), le mycélium a couvert le morceau de champignon et s'est ramifié sur l'agar. Ce mycélium était blanc, dense et filamenteux (fig. 6).

Si un mycélium bleu, vert ou gris se formait, il s'agirait d'un contaminant (Stamets *et al.*, 1983). La culture pourrait être sauvée, si les filaments mycéliens ne sont pas mêlés aux filaments des contaminants. Les souches isolées sous forme de culture pure doivent être préservées. La

préservation de la souche consiste à ralentir la croissance et à conserver la vigueur ainsi que la stabilité génétique du mycélium. Pour ce faire, certaines techniques comme les repiquages sont couramment utilisées. Cependant il n'est pas possible de transférer éternellement des cultures sur agar, car le mycélium dégénère. Pour réduire encore les risques de dégénérescence, il est préférable d'alterner les milieux riches et pauvres (Chang *et al.*, 1981). La conservation du mycélium à plus long terme doit s'effectuer à froid; une culture de mycélium sur PDA stockée sous huile minérale stérilisée peut être conservée au réfrigérateur pendant un an à 0°C. Au terme de cette période, le champignon doit être réactivé par un repiquage (Oei, 1996).

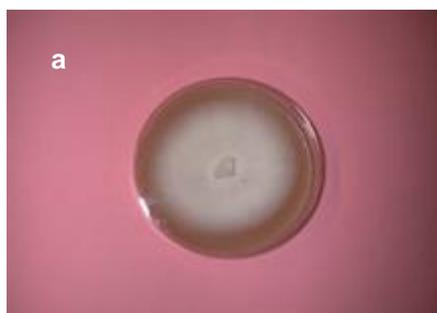


Figure 6 : culture pure en milieu gélosé dans une boîte de Pétri (a) et dans un tube (b).
Pure culture in agar medium in a Petri dish (a) and in a tube (b).

OBTENTION DU BLANC DE SEMIS

Après incubation à l'obscurité (20-25 °C) pendant deux semaines, le substrat a été complètement envahi par un mycélium blanc et vigoureux (fig. 7).



Figure 7 : Blanc de semis dans un pot (a) et dans des bocaux (b).

Seedling blank in a pot (a) and in jars (b).

FRUCTIFICATION DU CHAMPIGNON

La figure 8 montre les résultats des étapes allant de l'envahissement mycélien à la fructification. Après les six semaines d'incubation, sur les 80 sacs inoculés 14 ont montré un bon envahissement mycélien et une fructification acceptable (soit 17 % de sacs) (fig. 8 a). Avec un mycélium ayant viré au marron (fig. 8b), ces sacs ont été arrosés jusqu'à l'apparition des primordia qui ont évolué en fructifications adultes (fig. 8 c). Par ailleurs, 56 sacs se sont révélés stériles et 10 sacs ont été contaminés (figure 9).

La durée de l'envahissement mycélien varie selon les espèces et dépend du volume de substrat, de la température et du pourcentage

Un bon blanc a une croissance mycélienne vigoureuse et dépourvu d'autres micro-organismes; il peut être conservé au réfrigérateur à 4 °C pendant environ six mois. Le contrôle de la qualité du blanc consiste en une vérification régulière des récipients inoculés et le maintien des conditions d'hygiène strictes.

du grainensemencé. Pour un substrat ensaché sans compaction, etensemencé avec 2 à 5 % de grain, l'incubation durerait un à deux mois à une température comprise entre 20 et 30 °C (Quimio, 1986). Les résultats de notre étude (14 sacs ayant donné des champignons sur 80 ; 56 sacs stériles et 10 sacs contaminés) pourraient être dus non seulement à la durée d'incubation légèrement courte (six semaines), mais également au pourcentage moyen de grainsensemencés (3 %). Ces résultats peuvent également s'expliquer par l'utilisation d'un matériel purement traditionnel; notamment une armoire d'inoculation, à défaut d'une hotte à flux laminaire qui puisse garantir les conditions d'asepsie rigoureuses en milieu rural; pour mieux maintenir les conditions d'asepsie rigoureuses, l'idéal serait d'équiper l'intérieur de cette armoire d'une lampe U.V. qui resterait allumée pendant la phase de refroidissement (Oei, 1996).

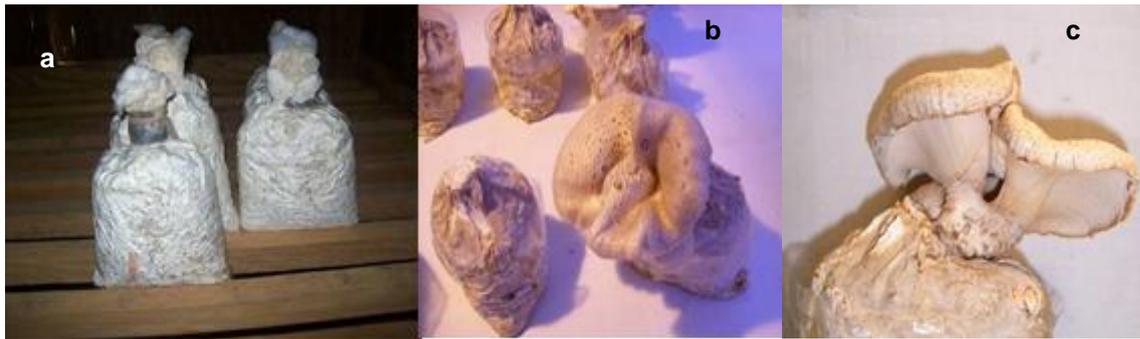


Figure 8 : Evolution du mycelium de production : envahissement mycélien (a), fructification (b et c).

Evolution of the production mycelium: mycelial invasion (a), fruiting (b and c).



Figure 9 : quelques sacs contaminés (présence d'une moisissure verte).

A few contaminated bags (presence of green mold).

CONCLUSION

La méthode utilisée a bien permis de domestiquer notre souche sauvage de *Lentinus squarrosulus* en utilisant essentiellement des matériaux locaux, notamment pour les étapes allant de la production du substrat de culture à la fructification. La couleur blanche, la structure et la vigueur du mycélium, ainsi que la fructification obtenue dans les 14 sacs indiquent que le matériel traditionnel utilisé a fonctionné correctement. Cependant, la stérilité de la majorité des sacs ainsi que les contaminations enregistrées peuvent être dues à la difficulté de réunir de véritables conditions d'asepsie nécessaires à l'ensemencement du mycélium dans le substrat. Des études orientées vers l'amélioration du rendement et la diversification des souches à domestiquer, ainsi que la vulgarisation des protocoles de mise en culture sont en cours et devraient permettre d'améliorer considérablement les conditions de vie des

populations locales. Notre travail a pris en compte les critères de sélection des sites de production des champignons, en l'occurrence les conditions climatiques convenant à l'espèce cultivée, la disponibilité de l'eau, la température, l'humidité, la ventilation, la lumière et un contrôle efficace des ravageurs. La domestication des souches locales ne pourrait être véritablement rentable et efficace que si le blanc de semis est fabriqué sur place par un technicien bien formé, et redistribué aux populations environnantes tout en leur apportant un appui technique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Gouvernement gabonais pour son appui multiforme, la Coopération française et la Coopération belge pour leur appui financier et logistique, le projet DACEFI de l'Union européenne pour son soutien financier et logistique.

REFERENCES

- Bruneton J. 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 4^e ed. Lavoisier, 1292 p.
- Cassano R., Etori S., Giacintucci S., Brunetti G., Markevitchi M., Venturi T. et Gitti M. 2010. On the connection Between Giant radio halos and cluster mergers. *The Astrophysical Journal Letters* 721: 82-85.
- Chang S.T. et Quimio T.H. 1981. Champignons tropicaux. Nature biologique et méthodes de culture. Hong-Kong, Presse universitaire chinoise, 318 p.
- Degreef J., Malaisse F., Rammeloo J. et Baudart E. 1997. Edible mushrooms of the Zambezi woodland area: a nutritional and ecological approach. *BASE* 1: 221-31.
- Dibaluka S. et Muambi S. 1992. Recherche sur la culture des champignons utiles d'Afrique centrale : essai de culture de *Lentinus tuberregium* (Fr.) Fr. *Revue de médecines et pharmacopées africaines* 8 (2) : 45-52.
- Eyi Ndong H. C., 2009. Etude des champignons de la forêt dense humide consommés par les populations du nord du Gabon. *PhD thesis*, Université Libre de Bruxelles, 271 p.
- Eyi Ndong H.C., Degreef J. et De Kessel A. 2011. Champignons comestibles des forêts denses d'Afrique centrale Taxonomie et Identification. *Abc Taxa* 10, 262p.
- Eyi Ndong H.C., Mengue Eyi S., Ndjouonkou A. L. et Codja J. T. C. 2020. Contribution à la connaissance des champignons médicinaux du Gabon. Identification et importance locale. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 133 (1-2) : 159-176.
- Karou S.D., Nadembega W.M.C., Ilboudo D.P., Ouemi D., Gbeassor M., De Souza C. et Simpore J. 2007. *Sada acuta* Burm. F.: a medicinal plant with numerous potencies. *African Journal of Biotechnology* 6 (25): 2953-2959.
- Nwanze P.I., Jatto W., Oranusi S. et Josiah S.J. 2006. Proximate analysis of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler. *African Journal of Biotechnology* 5 (4): 366-68.
- Oei P. 1996. Mushrooms cultivation. With special emphasis on appropriate techniques for developing countries. The Netherlands, Tool Publications Leiden. 274p.
- Oei P. 2003. Mushroom cultivation. 3^e ed. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers.
- Orango Bourdette J.O. 2017. Contribution à la lutte contre le cancer par la recherche de nouvelles molécules issues des champignons macroscopiques du Gabon. Mémoire de Master, Sciences biologiques, Université des sciences et techniques de Masuku, Franceville (Gabon), 71 p.
- Quimio T.H. 1986. Guide de culture à prix réduits de champignons sous les tropiques. Département de pathologie des plantes, Université de Los Banos, Laguna (Philippines).
- Quimio T.H., Chang S.T. et Royse D.J. 1990. Guide technique de culture des champignons sous les tropiques. *Production et protection des plantes, FAO document*, 106.
- Stamets P. et Chilton J.S., 1983. Le cultivateur de champignons. Un guide pratique pour faire pousser les champignons chez soi. *Olympia*, Washington, Agaricon.