

Effets des milieux de culture (PDA, SDA, SPDA, blé et maïs) sur la productivité in vitro de la souche P969 du *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm

Jean MONDO^{1*}, Alphonse BALEZI^{1,2}, Victor MUGOMOKA¹, Luc ZIGASHANE¹, Espoir BAGULA¹, Théophile KASHOSI¹, Jean Noël MPUTU^{1,3} et Gustave MUSHAGALUSA¹

¹ Faculté des Sciences agronomiques et Environnement, Université Evangélique en Afrique (UEA), Bukavu, République Démocratique du Congo

² Département de Biologie, Faculté des Sciences et Sciences appliquées, Université Officielle de Bukavu (UOB), Bukavu, République Démocratique du Congo

³ Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, Kinshasa, République Démocratique du Congo

* Correspondance, courriel : mondo.mubalama@yahoo.fr

Résumé

Le présent travail avait comme objectif d'évaluer l'effet de différents milieux de culture (PDA, SPDA, SDA, Maïs et Blé) sur le développement in vitro des mycéliums et le rendement en sporophores du *Pleurotus ostreatus* var. P969. Il s'est avéré que le diamètre ($p = 0,042$) et la vitesse ($p < 0,001$) de croissance du mycélium ont varié en fonction des différents milieux. Le milieu SDA a permis un bon développement du mycélium en culture in vitro (59,50 mm de diamètre mycélien). Le milieu à base du blé a été plus vulnérable aux infections en culture in vitro et le moins productif en mycélium. Les différents milieux utilisés en culture in vitro, n'ont pas eu d'influence significative sur les paramètres de rendement du champignon après fructification.

Mots-clés : *croissance mycélienne, rendement, champignon comestible, Sud-Kivu, RD Congo.*

Abstract

Effects of culture media (PDA, SDA, SPDA, wheat and corn) on the productivity of P969 strain of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. in vitro cultivation

The present work aimed to evaluate the effect of different culture media (PDA, SPDA, SDA, Corn and Wheat) on the in vitro development of mycelium and fruiting sporophore yield of *Pleurotus ostreatus* var. P969. It was found that the diameter ($p = 0.042$) and mycelium growth rate ($p < 0.001$) varied with different media. The medium SDA allowed good development of mycelium cultivated in vitro (59.50 mm diameter mycelial). The wheat medium was more vulnerable to infections in vitro cultivation and the least productive in mycelium. The different media used in in vitro culture have not had any significant influence on the performance of the sporophore parameters after fruiting.

Keywords : *mycelial growth, yield, edible mushroom, South-Kivu, DR Congo.*

1. Introduction

Un de plus grands facteurs de limitation de la culture du champignon comestible, est d'assurer la production et la disponibilité du blanc d'autant plus que cette production est exigeante en matériels, en substances coûteuses et surtout de l'expertise, particulièrement dans la préparation des milieux de culture [1 - 4]. La culture des champignons présente aussi un problème d'adaptabilité des souches sur les milieux de culture, puisque, certaines souches ont des préférences pour tel ou tel autre milieu spécifique [5]. Il est à noter que l'importation du blanc est aussi souvent entravée par la bureaucratie des services de douanes, les frais de transport élevés et la difficulté à garder le blanc à une basse température pendant le transport [6]. Si l'on veut donc produire les champignons comestibles à grande échelle ou même à titre expérimental, il faut toujours être capable de maîtriser toute la filière de la production à partir de la préparation du milieu gélosé jusqu'à la fructification [5]. Plusieurs auteurs ont rapporté que, le taux et la quantité de croissance des différentes souches des champignons du genre *Pleurotus ostreatus* diffèrent d'un milieu de culture à un autre [6 - 8]. La présente étude a évalué les effets de cinq milieux de culture sur la productivité in vitro de la souche P969 du *Pleurotus ostreatus*. Les effets sur les paramètres de rendement des sporophores venant de ces différents milieux ont également été évalués.

2. Méthodologie

2-1. Milieu d'étude

La présente étude a été menée à l'Université Evangélique en Afrique (UEA) située à 02°32'36,1" de Latitude Sud, 028°51'32,9" de Longitude Est et à 1661 mètres d'altitude. L'UEA est localisée à l'Est de la RD Congo, dans la ville de Bukavu.

2-2. Matériel et méthodes

La souche P969 de l'espèce de champignon *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. a été utilisée lors de l'expérimentation. Cette souche a été choisie suite à son adaptation dans la zone tropicale [9] et son appréciation par la population de la sous-région des Grands Lacs africains [10]. Le facteur en étude était le milieu de culture avec cinq modalités dont le PDA, SDA, Blé, SPDA et le Maïs. L'essai était effectué suivant un Dispositif Complètement Aléatoire (DAC). Les différents traitements avec trois répétitions sont repris à la **Figure 1**.

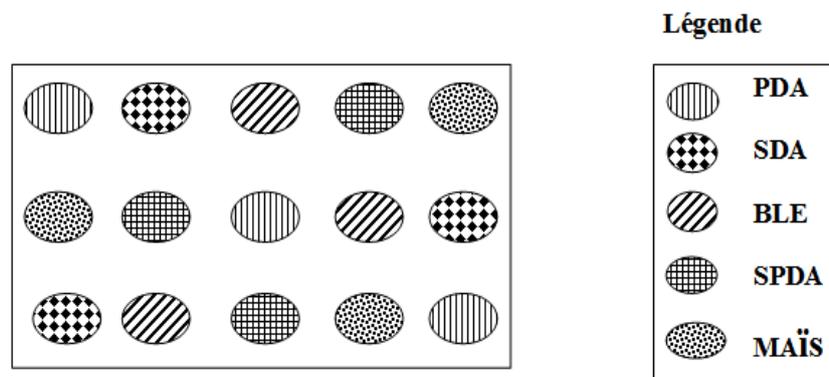


Figure 1 : Dispositif expérimental

2-2-1. Préparation des milieux de culture

La culture a été réalisée sur cinq milieux gélosés préparés localement de la manière ci-après :

- PDA (Potato Dextrose Agar) : Il a été préparé à base de la pomme de terre suivant les étapes suivantes : lavage des pommes de terre suivi du découpage et d'un pesage (100 g ont été nécessaire) à la balance de marque OHAUS (d'une précision de 0,001 g). Elles ont été cuites dans un bécher gradué de 1 L jusqu'au ramollissement, puis pressées à l'aide d'une cuillère de cuisine, filtrées dans un erlenmeyer gradué de 1 L et mélangées avec 10 g d'agar-agar et 10 g de dextrose. L'homogénéisation de la solution a été faite à partir d'un agitateur magnétique. L'erlenmeyer a été bouché par de l'ouate puis stérilisé à l'autoclave ;
- SPDA (Sweet Potato Dextrose Agar) : le milieu a été préparé à base des patates douces préalablement lavées et coupées en morceaux puis : peser 100 g de patates douces, les bouillir dans un bécher de 1 L, mélanger dans un erlenmeyer de 1 L avec 10 g de dextrose et 10 g d'agar-agar, homogénéiser à l'agitateur, boucher à l'ouate puis stériliser à l'autoclave ;
- SDA (Sabouraud Dextrose Agar) : ce milieu SDA a été préparé de la manière suivante : peser 9 g de son de riz, le mélanger dans un bécher avec de l'eau distillée puis chauffer la solution, le filtrat obtenu est mis dans un erlenmeyer de 1 L, ajouter 9 g de dextrose et 9 g d'agar-agar, homogénéiser puis mettre à l'autoclave pour stérilisation ;
- Milieu Maïs : 20 g de farine de maïs et 5 g d'agar-agar mélangé dans l'eau distillée, chauffé puis mis dans un erlenmeyer, homogénéiser à l'agitateur, et boucher à l'ouate puis mis à l'autoclave ;
- Milieu Blé : Dissoudre 100 g de farine de blé dans de l'eau distillée, ajouter 10 g d'agar-agar et 10 g de glucose (sucre de table), ramener la solution à 500 ml (soit 1 / 5 litre) à l'aide de l'eau distillée, et après homogénéisation, la solution est placée à l'autoclave pour stérilisation.

La stérilisation de tous les milieux de culture a été faite à l'autoclave pendant 15 minutes sous une température de 121°C. Après stérilisation, les solutions sont refroidies pendant 30 minutes, puis coulées dans des boîtes de pétri. La sporulation est obtenue en plaçant au milieu des boîtes de pétri contenant les milieux de culture, un morceau de champignon d'environ 3 mm x 1 mm prélevé au cœur (à l'insertion du stipe sur le chapeau) d'un champignon frais et jeune, puis rebouchée en conditions aseptiques au-dessus de la flamme d'un bec bunsen de marque Oryx et le scalpel nettoyé à l'alcool. Les boîtes sont par la suite placées dans un incubateur à la température constante de 25°C [6].

2-2-2. Préparation du blanc de semis

- La culture de semis consiste à favoriser le développement du mycélium sur un substrat adéquat et stérile. Pour ce faire, le substrat à base des grains du sorgho a été utilisé. Ces derniers étaient cuits à l'aide d'une plaque chauffante pendant 25 minutes, puis essorés à l'air libre pour les débarrasser de l'eau en excès. Après, on y a ajouté le son de riz en raison de 100 g pour 1 kg de sorgho. Le mélange a ensuite été reparti dans des bocaux hermétiquement fermés et coiffés d'un tampon d'ouate placé au milieu d'un couvercle vissé. Chaque bocal recevait 300 g de grains de sorgho. Enfin, il a été stérilisé à l'autoclave à une température de 121°C pendant 1 heure ;
- Après stérilisation, les bocaux ont été refroidis pendant 45 minutes. L'inoculation du mycélium (développé dans les boîtes de pétri) y était faite à côté d'un bec bunsen. Les matériels de prélèvement et de transfert de l'inoculum sont directement stérilisés à la flamme. L'incubation des grains de sorgho est ensuite réalisée à des conditions de température de 27°C pendant 21 jours dans un local obscurci. Le produit obtenu à l'issue de cette opération est le « blanc-mère » ou « blanc de semi » et sera utilisé ultérieurement pour ensemercer (larder) le substrat de fructification (semence tertiaire).

2-2-3. Préparation du substrat de fructification [10]

- Comme substrat, les feuilles sèches de bananier accessibles localement ont été utilisées, trempées pendant 30 minutes et égouttées pendant 24 heures. Le remplissage et l'ajout d'ingrédients ont été faits dans des sachets en plastique thermorésistants de 30 cm x 17 cm recevant respectivement 1000 g de substrat. Un morceau d'ouate, en raison de 3 cm de hauteur et 2,5 à 3 cm de diamètre, a été placé à l'ouverture du sachet et a été ligoté à l'aide d'un anneau élastique. Les substrats ainsi ensachés sont stérilisés à la vapeur humide dans un demi-fût pendant 2 heures et demie ;
- Le lardage (ou ensemencement) a été réalisé en condition aseptique. Et le blanc-mère a servi d'inoculum en raison de 3 % de blanc introduit dans trois trous préalablement faits sur le substrat. Les sachets sont ensuite hermétiquement fermés à l'aide du scotch aux différents points d'ensemencement. L'incubation a eu lieu dans un milieu obscurci sur des étagères en bois et à une température moyenne de 25°C pendant 3 à 4 semaines. Une uniformisation des conditions d'incubation a été assurée par un déplacement aléatoire des sachets de culture sur étagère une à deux fois par semaine. L'incubation a été maintenue jusqu'à la colonisation totale du substrat de production par le mycélium et apparition des premiers primordiaux ;
- Les substrats ont ensuite été dépourvus de leur sachets puis enfouis dans le sol dans un abri dont les murs et la toiture ont été faits des bâches et à l'intérieur duquel règne une température variant entre 23° et 28 °C pendant la journée. L'arrosage à l'eau du robinet était fait deux à trois fois par jour. Ceci a permis de garder un taux d'humidité élevé dans le sol de gobetage. Deux semaines après cette mise en terre, la première récolte a été réalisée.

2-2-4. Paramètres observés

- Longueur et vitesse de croissance des mycéliums dans la boîte de pétri : la longueur a été mesurée à l'aide d'un ruban gradué. La vitesse de croissance quant à elle a été calculée en utilisant la formule suivante : $V_n - V_{n-1}$, ensuite la moyenne de variation fut calculée, $V_1 + V_2 + V_n \dots /$ Nombre des jours d'observation ;
- Vitesse de croissance du mycélium au niveau du blanc de semi dans des bocaux par le même principe décrit précédemment ;
- Le diamètre du carpophore : a été mesuré à l'aide d'un ruban gradué, en prenant la longueur du carpophore dans les deux sens. Ensuite, on fit la moyenne en utilisant la formule suivante : $(L1 + L2) / 2$. La mesure a été exprimée en centimètre ;
- La hauteur du stipe : La hauteur a été mesurée à l'aide d'un ruban gradué et la hauteur se prendait de la base du stipe jusqu'au sommet (à l'insertion au chapeau) ;
- Taux d'infection : le taux de mortalité a été estimé en prenant le nombre des boîtes infectées multiplié par 100 et divisé par le nombre total des boîtes inoculées ;
- Le poids total (en g) des sporophores a été mesuré par une balance de précision ;
- Le nombre des touffes, le nombre d'avortons, le nombre des pieds par touffe ont été obtenus par comptage manuel.

2-3. Analyses statistiques des données

L'entrée des données et le dessin des figures ont été faits à l'aide de Microsoft Excel. L'analyse statistique des données a été faite à l'aide du logiciel Statistix version 8.0. Le test d'ANOVA a été utilisé pour la

comparaison des moyennes. La séparation des moyennes a été faite à l'aide du test LSD au seuil de signification de 5 %. La distribution des données a été évaluée par le test de Shapiro et Wilk.

3. Résultats

Résultats relatifs aux effets des milieux de culture en culture in vitro ou semence primaire. Les résultats relatifs aux taux d'infection enregistrés sur les différents milieux de culture sont représentés à la **Figure 2**.

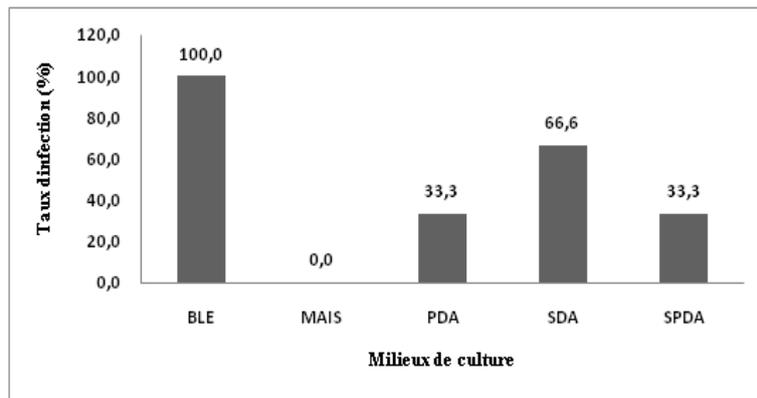


Figure 2 : Taux d'infection sur les différents milieux de culture

Le taux d'infection est variable d'un milieu à l'autre. Le plus élevé a été observé sur le milieu à base du Blé (100 %) alors que le milieu à base du Maïs n'a présenté aucune infection (0,0 %). Aucune différence n'a été enregistrée entre le PDA et le SPDA (33,3 %). La **Figure 3** présente les résultats sur l'évolution du diamètre du mycélium en fonction des différents milieux de culture tout au long de la période d'observation.

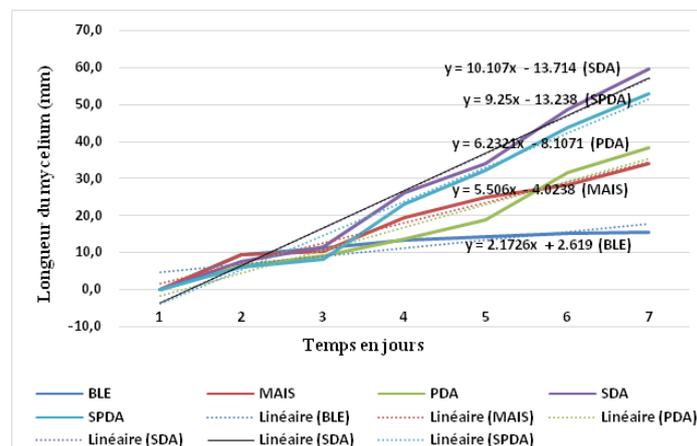


Figure 3 : Diamètre du mycélium en fonction du temps d'observation

L'analyse de la variance a montré que le diamètre du mycélium a varié en fonction de différents milieux de culture ($p = 0,042$), le diamètre du mycélium le plus élevé a été observé sur le milieu SDA (59,50 mm), suivi du milieu SPDA avec un diamètre de 53,00 mm. L'inoculum ayant le plus court mycélium était développé sur le milieu à base du Blé. La **Figure 4** présente les résultats sur la vitesse de croissance journalière (en mm / jour) du mycélium en fonction des différents milieux de culture.

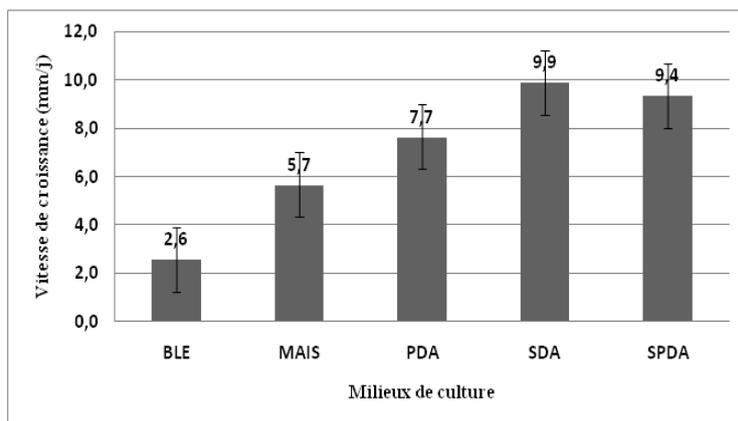


Figure 4 : *Vitesse de croissance moyenne journalière (en mm / j) du mycélium*

Les résultats montrent que la vitesse de croissance a varié en fonction des différents milieux de culture ($p < 0,001$). La vitesse de croissance la plus élevée a été observée, sur le milieu SDA (9,9 mm / jour) et sur milieu SPDA (9,4 mm / jour). Le résultat de la séparation des moyennes des vitesses de croissance montrent qu'aucune différence n'a été observée entre les deux milieux (SDA et SPDA). La vitesse la plus faible a été observée sur le milieu à base du Blé (2,6 mm / jour). Résultats relatifs à la production de la semence secondaire ou blanc de semi. Pour cette partie relative au blanc de semi, seuls les milieux de culture ayant affiché un bon développement mycélien ont été maintenus pour la poursuite de l'expérimentation. Ceux qui ont été sujets aux infections n'ont pas été utilisés pour la suite. Les résultats de la **Figure 5** reviennent sur la vitesse moyenne de croissance du mycélium du blanc de semi.

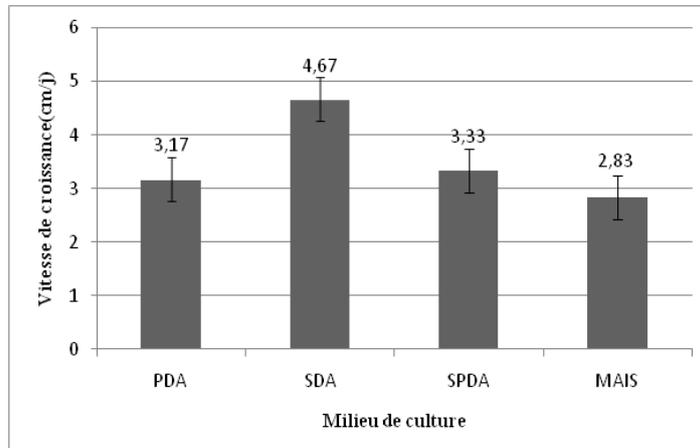


Figure 5 : *Effet des milieux de culture sur la vitesse de croissance mycélienne (cm / semaine)*

La vitesse a varié significativement d'un milieu de culture à l'autre ($p = 0,035$). Cette figure montre que la vitesse de croissance la plus élevée a été observée sur le milieu à base de SDA (4,67 cm / semaine), suivi du milieu SPDA (3,33 cm / semaine). La plus faible vitesse de croissance a été observée sur le milieu à base du MAIS (2,83 cm / semaine). Résultats relatifs à la production de la semence tertiaire ou substrat de fructification. Pour cette partie de préparation de la semence tertiaire, seuls les milieux de culture ayant affiché précédemment un bon développement ont été maintenus dans la poursuite de l'expérimentation. Ceux qui ont été sujet aux infections n'ont pas été utilisés pour la suite.

Tableau 4 : Effets de milieux de culture sur les paramètres du rendement du champignon

Milieux	Diamètre (cm)	Hauteur (cm)	Poids (g)	Pieds par Touffes (no)	Touffes (no)	Avortons (no)
PDA	5,90 a	2,82 a	70,00 a	6,33 a	2,33 a	18,33 a
SPDA	5,70 a	2,83 a	78,33 a	9,00 a	2,00 a	14,00 a
MAIS	5.89 a	3,09 a	77,67 a	8,67 a	2,33 a	13,00 a

Les moyennes de même colonne suivies des lettres identiques ne sont pas statistiquement différentes au seuil de signification de 5 % du test LSD

Partant de ces résultats, la séparation de moyennes nous amène à conclure que le milieu de culture d'origine n'a pas eu d'influence significative sur les différents paramètres de rendement du champignon.

4. Discussion

Les résultats trouvés ont montré qu'il y a eu d'effets des milieux de culture sur le développement des mycéliums en culture in vitro. Le milieu à base de SDA a permis une bonne croissance et développement du mycélium. [6] ont montré que le milieu SDA améliorerait également la vitesse de croissance mycélienne quelle que soit l'espèce mise en culture. Ils ont montré également à l'issue de leurs essais que ce sont les *Lentinus* et les *Pleurotus* qui enregistrent les vitesses de croissance mycélienne les plus élevées, de l'ordre de 0,8 à 0,9 cm par jour sur milieu SDA. Les résultats trouvés au Nigeria par [11] démontrent également la même tendance où le SDA (6,2 cm) est plus productif que le PDA (4,4 cm). Une stimulation de la croissance semble être observée dans les milieux de culture contenant des amino acides, des vitamines, et des nutriments essentiels, lesquels combinés, influencent significativement la croissance mycélienne sur ces milieux de culture. Ce point de vue est aussi appuyé par [12] qui analysaient les effets des amino acides et des acides aspartiques sur la croissance mycélienne chez le genre *Tricholoma* et qui avait trouvé que tous les composants permettaient d'accélérer la croissance mycélienne. Toutes ces études montrent que le milieu à base du blé était plus performant que le SDA et le PDA mais dans notre étude, il a été prématurément sujet aux infections. Ceci serait dû à sa forte concentration en nutriments qui aurait attiré des champignons compétiteurs et des bactéries qui ont pourtant une croissance rapide par rapport aux champignons cultivés.

5. Conclusion

Le comportement de la souche P969 du *Pleurotus ostreatus* a été différent d'un milieu de culture à l'autre. Le milieu de culture à base de SDA a présenté une vitesse de croissance élevée mais diffère non significativement du SPDA. La plus faible vitesse de croissance a été enregistrée sur le milieu à base du Blé. Le milieu à base du Blé a été plus vulnérable aux infections avec un taux d'infection de 100 %. En production du blanc de semi, la vigueur dépendait du milieu de culture d'origine (le SDA y a affiché une vitesse de croissance la plus élevée). Les milieux de culture d'origine n'ont cependant pas influencé significativement les différents paramètres de rendement du champignon lors de la fructification.

Remerciements

Nos remerciements à l'organisme allemand Pains pour le Monde (EED), au FAST Africa, DIOBASS et à l'Université Évangélique en Afrique (UEA), pour l'accord des moyens financiers et matériels, nécessaires dans la conduite de la présente étude.

Références

- [1] - H. O. STANLEY, Effect of substrates of spawn production on mycelial growth of oyster mushroom species. Agriculture and Biology Journal of North America, 1(5) (2010) 817 - 820.
- [2] - V. N. BRAM et D. F. JANNA, Culture à petite échelle de champignons-2 : Agaricus et Volvariella. Serie Agrodok 41, Fondation Agromisa et CTA, Wageningen, Pays-Bas, (2007) 91.
- [3] - H. N. UKOIMA, L. O. OGBONNAYA, G. E. ARIKPO and F. N. IKPE, Cultural Studies of Mycelia of *Volvariella volvacea*, *Pleurotus tuber-regium* and *Pleurotus sajor-caju* on Different Culture Media. Pakistan Journal of Nutrition, 8(7) (2009) 1052 - 1054.
- [4] - I. M. DIANSAMBU, S. M. DIBALUKA, J. K. LUMANDE et J. DEGREEF, Culture de trois espèces fongiques sauvages comestibles du Groupement de Kisantu (R.D. Congo) sur des substrats ligno-cellulosiques compostés. Afrique SCIENCE, 11(3) (2015) 241 - 261.
- [5] - S. T. CHANG, World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. in China. Intl. J. Medicinal Mushrooms, 1(1999) 291 - 300.
- [6] - S. M. DIBALUKA, F. L. LUKOKI, A. DE KESEL et J. DEGREEF, Essais de culture de quelques champignons lignicoles comestibles de la région de Kinshasa (R. D. Congo) sur divers substrats lignocellulosiques. Biotechnol Agron. Soc. Environ, (2010) 417 - 422.
- [7] - E. E. MOSIBONO, M. H. HABARI et J. J. PAULUS, Essai de culture mycélienne de quelques champignons comestibles zairois sur milieu semi-synthétique. Tropicultura, 9 (1991) 138 - 139.
- [8] - I. O. DUDKA et al., Cultural aspects of strains of higher basidiomycetes from the genera *Pleurotus* and *Lentinus*. Ukr. Bot. Zh., 33(6) (1976) 582 - 596.
- [9] - Z. LIN, *Juncao* technology. Fujian Agriculture & Forestry University, (2006) 143.
- [10] - J. M. MONDO, E. M. BAGULA, A. Z. BALEZI et G. N. MUSHAGALUSA, Effets des substrats à base de fanes de haricot et de feuilles de bananier sur la productivité des souches de *Pleurotus ostreatus* (P969 et HK51) sur étagère et gobetage. Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement, (2016) 9.
- [11] - H. O. STANLEY et C. U. NYENKE, Cultural Studies on Mycelia of *Pleurotus pulmonarius* (Oyster Mushroom) in Selected Culture Media. Int. Journ. Sci. Nat., 2(2) (2011) 183 - 185.
- [12] - M. KADIRI et I. A. KEHINDE, Production of grain mother and planting spawns of *Lentinus suhnudus*. Nigerian J. Rot., 12 (1990) 37 - 44.