

Caractérisation de souches cultivées d'un nouveau champignon comestible : *Stropharia rugoso-annulata*. II. Anatomie, développement mycélien et fructification

Characterization of cultivated strains of a new edible mushroom: Stropharia rugoso-annulata. II. Anatomy, mycelium development and fructification

MICHÈLE BONENFANT-MAGNÉ¹, CHRISTIAN MAGNÉ^{2*}, CÉCILE LEMOINE¹

¹ Laboratoire de botanique appliquée, université de Rennes-I, campus de Beaulieu, avenue du Général-Leclerc, 35042 Rennes cedex ;

² Laboratoire de biologie et physiologie végétales, université de Reims, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

RÉSUMÉ

Dans le cadre d'un travail destiné à proposer une méthodologie de production performante du champignon comestible *Stropharia rugoso-annulata*, une étude des caractéristiques anatomiques et physiologiques du basidiomycète a été entreprise. En microscopie électronique à balayage, les souches testées ne montrent pas de différences morphologiques. La germination des spores ne peut être obtenue qu'en présence de mycélium dicaryotique en développement. L'effet de la température sur la vitesse de croissance permet de distinguer trois groupes de souches, indépendamment des groupes phénotypiques. Ces souches présentent toutes un optimum de croissance à 25 °C et tolèrent des températures élevées. En milieu liquide, le pH initial ne modifie pas la quantité de mycélium produit. En revanche, le milieu s'acidifie nettement pendant la croissance (pH 3,5) sans que l'on y détecte d'acides organiques. Un premier essai de culture montre que la durée d'envahissement du substrat a un effet sur la fructification du basidiomycète, donc sur le rendement de la récolte.

Mots clés : champignon cultivé, basidiomycète, *Stropharia rugoso-annulata*; développement mycélien, acidification, fructification, biodiversité

ABSTRACT

To establish a performing production strategy for the edible mushroom *Stropharia rugoso-annulata*, investigations on anatomy and physiological characteristics of the basidiomycete were carried out. Scanning electron microscopy analysis of *Stropharia* strains revealed no significant morphological differences. Spore germination was only obtained in the presence of growing mycelium. On the basis of the influence of temperature on the growth rate of *Stropharia* strains, three groups were defined without relation to phenotypic classification. Moreover, every strain exhibited a higher growth rate at 25 °C, and residual growth was observed above 35 °C. The pH of the medium did not affect mycelium development.

Note présentée par Michel Thellier

Note remise le 20 mars 1997, acceptée après révision le 22 septembre 1997

*Correspondance tirés à part

Regardless of the initial pH value, after 2 weeks of mycelium growth, the pH was established at a value close to 3.5. However, no acidic compounds were detected in this medium. A preliminary cultivation trial indicated that carpophore formation is strongly affected by spawn run time.

Key words: edible fungi, basidiomycete, *Stropharia rugoso-annulata*, mycelium development, acidification, fructification, biodiversity

Abridged version (see p. 924)

Introduction

Une volonté de diversification de la production de champignons comestibles a incité de nombreuses équipes de recherche à développer des travaux sur un ensemble de champignons saprophytes. Ces travaux consistent généralement à caractériser différentes souches du champignon, à tester leurs potentialités et à définir leurs conditions de culture. Dès 1969, la domestication du strophaire (*Stropharia rugoso-annulata* Farlow ex Murrill) a été proposée par Puschel en Allemagne [1]. Cette espèce est la seule espèce cultivée dans la famille des Strophariacées. Elle appartient à l'ordre des Agaricales comme les principales espèces cultivées dans le monde (agarics, pleurotes, shiitake, volvaires, pied-bleu,...).

La culture du strophaire a été menée de façon extensive, c'est-à-dire en plein air en conditions non contrôlées, dans différents pays d'Europe tels que l'Allemagne [1, 2], la Hongrie [3, 4], la Tchécoslovaquie [5], la Russie [6] et la Pologne [7]. Les irrégularités de production et de rendement ont été à l'origine de l'abandon progressif des cultures malgré plusieurs adaptations [8–10]. En fait, la proposition d'une technologie de production performante nécessite la maîtrise du développement du basidiomycète, ce qui implique une connaissance accrue des exigences du développement mycélien et de ses caractéristiques physiologiques. Ces connaissances permettront de réunir les conditions optimales du développement et de la fructification du champignon en culture.

Dans ce but, une série de travaux de recherche sur l'espèce *Stropharia rugoso-annulata* ont été entrepris dans notre laboratoire au début des années 1990. Les différentes souches cultivées, conservées dans leurs laboratoires d'origine ou par les producteurs de mycélium, ont été regroupées au sein d'une collection unique et une analyse de la diversité variétale a été entreprise. La comparaison des profils électrophorétiques des protéines totales ou de divers systèmes enzymatiques a permis de distinguer nettement deux groupes phénotypiques de souches [11]. Ces conclusions sont renforcées par une différence de coloration des carpophores produits lors des essais de culture en conditions contrôlées [12]. Le premier groupe est constitué de sept souches d'origines belge, allemande, hongroise et française. Ce groupe très homogène est caractérisé par la production de carpophores à chapeau brun. Le deuxième groupe est formé de quatre souches

d'origines allemande et hongroise, caractérisées par la production de carpophores de teinte pâle (jaune ou blanc). Seules deux souches allemandes (GRD et T54) semblent se différencier des deux groupes phénotypiques précédents et constituent ainsi une source de variabilité au sein de l'espèce [11]. Nous présentons ici les résultats d'une étude sur les caractéristiques anatomiques et physiologiques de souches de strophaire. Cette étude est complétée par un premier essai de culture du champignon visant à décrire l'effet de la durée du développement mycélien au sein du substrat sur la précocité et l'importance de la fructification.

Matériels et méthodes

Matériel biologique

Treize souches de strophaire, disponibles sous forme de mycélium dicaryotique, ont été rassemblées. Utilisées en culture, ces souches proviennent de huit laboratoires ou producteurs de mycélium européens. Une caractérisation préalable de ces souches par électrophorèse des protéines [11] nous a permis de définir trois groupes notés :

- groupe I à carpophores bruns (souches : IT, 610, Z10, WD, WH, F700, LM),
- groupe II à carpophores clairs (souches : L3G, GD, GH, LH),
- groupe III regroupant deux souches allemandes (GRD et T54), à petits carpophores bruns généralement déformés.

Comme indiqué ultérieurement, l'étude physiologique du développement mycélien porte tantôt sur l'ensemble des souches réunies, tantôt sur quelques souches représentatives des trois groupes ci-dessus.

Milieux de culture

Les milieux nutritifs utilisés pour permettre le développement mycélien en boîte de Pétri sont deux milieux solides constitués de 10 g/L (milieu M1) ou 20 g/L (milieu M2) de malt. Ces milieux sont stérilisés par autoclavage (20 min à 110 °C) après l'addition d'agar (15 g/L).

Pour l'étude de la germination des spores, le milieu Raper [13] est utilisé sous différentes formes : complet, dilué (50 ou 25 %), gélosé (+ agar 15 g/L), acidifié (+ HCl, pH 4,1) ou enrichi en vitamines (Thiamine 1 µg/mL). Les étalements de la suspension sporale (400 à 450 10³ spo-

res/mL) sont réalisés sur milieu Raper gélosé ; lors de l'étude de la germination en milieu liquide, le milieu Raper (dilué à 50 %) est utilisé à pH 6,7 ou acidifié (pH 4), et enrichi ou non en thiamine. La densité de spores est alors de 20 à 25 000 spores/mL de solution nutritive. Les essais de germination sont réalisés à l'obscurité à 25 ou 30 °C. L'estimation du taux de germination en milieu liquide est réalisée après 4 j d'incubation, par comptage sur une cellule de Malassez.

Développement mycélien en milieu liquide

Les cultures en milieu liquide sont réalisées dans des flacons de 65 mL contenant 25 mL de milieu M1 (pH 6), fermés à l'aide d'un bouchon de coton et stérilisés. Une large gamme de pH pour les milieux de culture est testée grâce à l'addition d'HCl ou de NaOH. Dans tous les cas, les pH sont vérifiés après autoclavage. Un fragment de mycélium (5 mm de diamètre) en développement sur milieu M1 gélosé est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce et introduit dans le milieu M1 liquide en conditions stériles. La croissance s'effectue à l'obscurité, en l'absence d'agitation, à 20 °C avec six répétitions par essai. En fin de culture, le mycélium est récupéré, rincé et séché dans une étuve à 45 °C pendant 24 h avant d'être pesé.

Lorsque les milieux de culture sont destinés à une analyse de leur composition en fin d'étude, la culture du mycélium est réalisée dans un milieu constitué uniquement d'une source de carbone, le glucose à 20 g/L ; la composition est ainsi simplifiée à l'extrême, et l'analyse en fin de croissance s'en trouve facilitée. Cette analyse est réalisée selon plusieurs techniques parmi lesquelles la chromatographie sur papier, la RMN du carbone 13 en abondance naturelle et la HPLC (sur colonne Aminex HPX-87H pour sucres et acides organiques).

Étude microscopique du mycélium et des carpophores

Les échantillons de carpophore ou de mycélium en développement sont examinés en microscopie électronique à balayage. Au préalable, ils sont déshydratés par des bains successifs dans l'éthanol de degré croissant jusqu'à l'alcool absolu. Après passage au point critique et ombrage sous vide à l'or-palladium, les observations sont réalisées sur un microscope à balayage de type JSM 6400 (JEOL).

Production de carpophores

Au départ de l'essai de culture, le champignon se présente sous forme de mycélium dicaryotique (« blanc »), développé en conditions stériles sur grains de millet. Deux souches (WH et GD), appartenant à deux groupes phénotypiques différents, sont utilisées. Le champignon est introduit (= lardage) au sein d'un substrat selon un taux de 6 % en volume. Le substrat utilisé est un mélange hydraté de paille et de rafles de maïs concassées (75-25 v/v), disposé en barquettes de 2 L. Pour l'essai, six barquettes (= six répétitions) sont réalisées pour chaque souche. Chacune des barquettes est placée en salle de culture à

20–22 °C pour permettre le développement végétatif du mycélium. Différentes durées d'incubation, allant jusqu'à 4 semaines, sont testées. Pour la fructification, les barquettes sont ensuite transférées à 17 °C à l'obscurité et recouvertes (= gobetage) d'une couche de 1 à 2 cm de terre constituée d'un mélange de mærl, de tourbe et d'eau (1-14-5 v/v).

Résultats

Description anatomique

Pour l'étude anatomique, des souches ont été choisies parmi chacun des groupes phénotypiques. Pour chacune de ces souches, les appareils végétatif (mycélium) et reproducteur (hyménium) observés au microscope électronique à balayage se sont révélés similaires. Chaque souche présente un mycélium dicaryotique comme en témoignent les nombreuses anses de dangardie observées sur le mycélium en croissance (*figure 1A*). Chez les champignons âgés, les lamelles formant l'hyménium, d'abord rosées, prennent la couleur violette caractéristique des spores chez la famille des Strophariacées. La trame des lamelles est régulière. Sur l'arête des lamelles, deux types d'éléments stériles sont visibles, les chéilocystides. Les plus représentés sont en forme d'outre, d'un diamètre de 10 µm et prolongés en pointe (*figure 1B*). D'autres cystides stériles ont une extrémité arrondie (*figure 1C*). Les éléments fertiles sont les basides claviformes donnant généralement, après réduction chromatique de chaque noyau, quatre basidiospores (*figure 1D*). Ces spores, de taille sensiblement identique (8 × 6 µm) chez les différentes souches étudiées, semblent lisses lorsqu'elles sont observées au microscope optique et apparaissent légèrement pelucheuses en microscopie électronique à balayage. Elles présentent un large pore (1 µm de diamètre) et un apicule court, point d'attache avec le stérigmate.

Germination des spores

À partir d'une sporée provenant de carpophores de première volée, nous avons tenté d'obtenir les conditions favorables à la germination des basidiospores. Quelles que soient les conditions testées – étalement sur milieu gélosé Raper complet ou dilué, suspension dans le milieu liquide Raper dilué (50 %) à pH 6 ou 4, enrichissement en vitamines (thiamine) ou non –, la germination d'une spore n'a pu être observée après 8 j d'expérimentation. Différentes températures d'incubation ont été testées sans pour autant améliorer le résultat. Seule l'introduction dans le milieu d'un fragment de mycélium dicaryotique en développement a permis d'obtenir le déclenchement de la germination des spores. Le taux maximal de germination alors observé après 4 j est de 15,3 % en milieu liquide (Raper) dilué, de pH 6 (valeurs non présentées). En outre, notons que l'addition de vitamines, sous la forme de thiamine, n'a pas d'effet sur ce taux de germination.

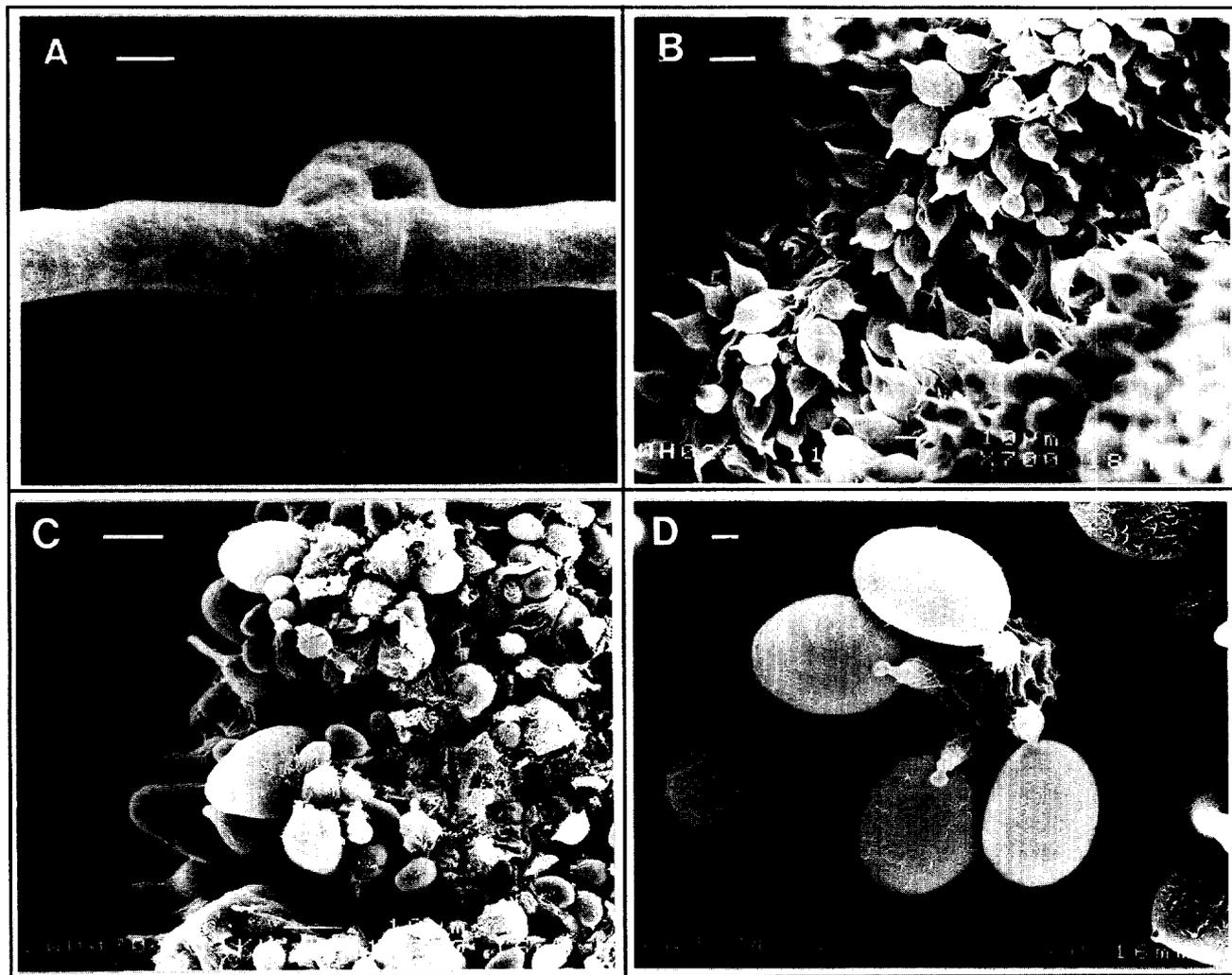


Figure 1. Étude histologique de *Stropharia rugoso-annulata* réalisée en microscopie électronique à balayage.

A. Anse de dangeardie sur mycélium dicaryotique. B. Éléments stériles sur l'arête des lamelles. C. Différents types de cheilocystides. D. Tétrade de basidiospores. Les traits correspondent à 1 μm sur les photos A et D, et 10 μm sur les photos B et C.

Effet de la température sur le développement mycélien

L'effet de la température sur la croissance mycélienne est évalué sur milieu nutritif gélosé (M2) après 7 j de développement pour chacune des souches en collection (cinq répétitions par souche). Deux à trois diamètres sont mesurés par colonie, et le diamètre moyen de développement des hyphes est étudié pour une gamme de températures allant de 15 à 40 °C. En regroupant les valeurs moyennes de croissance, la courbe obtenue permet de déterminer la température optimale de croissance. Celle-ci est de 25 °C quelle que soit la souche (figure 2).

Cependant, des différences de vitesse dans la croissance du mycélium ont été décelées selon les souches. Trois groupes ont ainsi été définis indépendamment de leur appartenance phénotypique (figure 3). Les différences sont particulièrement nettes à la température optimale

de développement, où les vitesses varient de 6,7 mm/24 h dans le groupe à croissance rapide (I), à 5,5 mm/24 h dans le groupe intermédiaire (II) et à 4,2 mm/24 h dans le troisième groupe à croissance lente (III). Les trois souches (LH, T54, WD) présentant une croissance particulièrement rapide pour les températures de 25 et 30 °C proviennent chacune d'un groupe phénotypique différent. Le deuxième groupe, à vitesse de croissance intermédiaire, est constitué de six souches : trois souches brunes (Z10, WH, 610), deux souches blondes (GD, L3G) et la souche GRD. Toutefois, dès 30 °C, la vitesse de croissance de ces souches n'est plus différente significativement de celle d'un troisième groupe de souches. Ces dernières sont caractérisées par une vitesse de croissance presque constante pour des températures comprises entre 20 et 30 °C. Il s'agit de trois souches brunes (LM, F700, IT) et une souche blonde (GH).

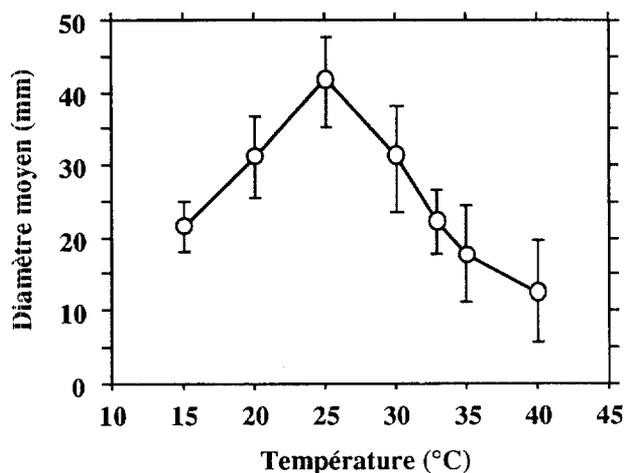


Figure 2. Effet de la température sur le développement mycélien des souches de strophaire après 7 j de culture en milieu solide.

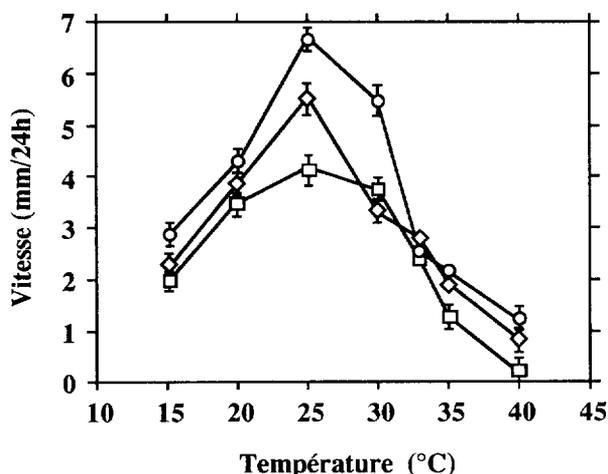


Figure 3. Effet de la température sur la vitesse moyenne du développement mycélien des souches à croissance rapide (○), intermédiaire (◇) et lente (□).

Développement mycélien en milieu liquide

Croissance en fonction du temps

La croissance pondérale du mycélium sur 25 mL de milieu liquide M1 (pH 6) a été évaluée au cours de 6 semaines de culture. Deux souches ont été retenues pour l'étude, la souche brune IT et la souche T54, qui appartiennent respectivement aux groupes à croissance lente et rapide. Les courbes de croissance obtenues mettent en évidence trois phases au cours du développement (figure 4). Durant les 7 premiers j de culture, la croissance pondérale est relativement faible. Ensuite, et jusqu'au 28^e jour après l'inoculation, on enregistre une forte progression du développement mycélien, selon une vitesse constante et une amplitude différente selon la souche. Le retard pris initia-

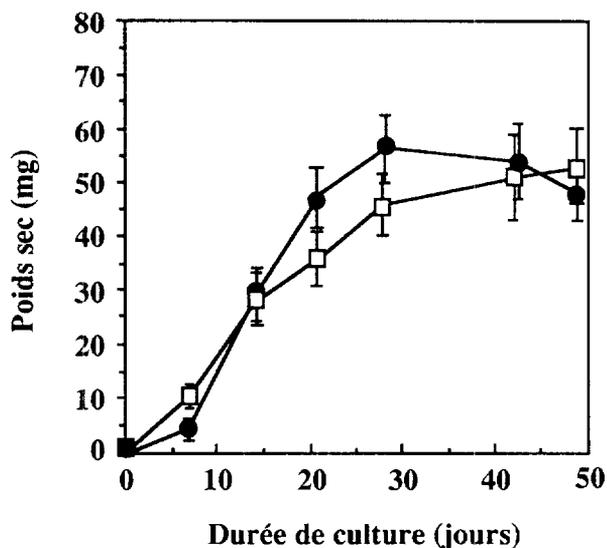


Figure 4. Cinétique de la production de mycélium en milieu liquide (M1) chez une souche à croissance rapide (T54, ◻) et chez une souche à croissance lente (IT, ●).

lement par la souche IT est alors comblé. Après 28 j, un palier apparaît pour lequel la croissance mycélienne devient très faible (souche T54). Pour la souche IT, les pesées réalisées après 6 et 7 semaines de culture semblent même annoncer une diminution du poids sec de mycélium récolté. Cette diminution de poids sec est enregistrée alors qu'une autolyse du mycélium est observée sur milieu gélosé au centre de la colonie.

Le mycélium en croissance modifie considérablement le pH du milieu de culture. On enregistre ainsi une forte acidification de celui-ci, ceci dès les premiers jours de croissance (figure 5). Après 14 j de culture, alors que la

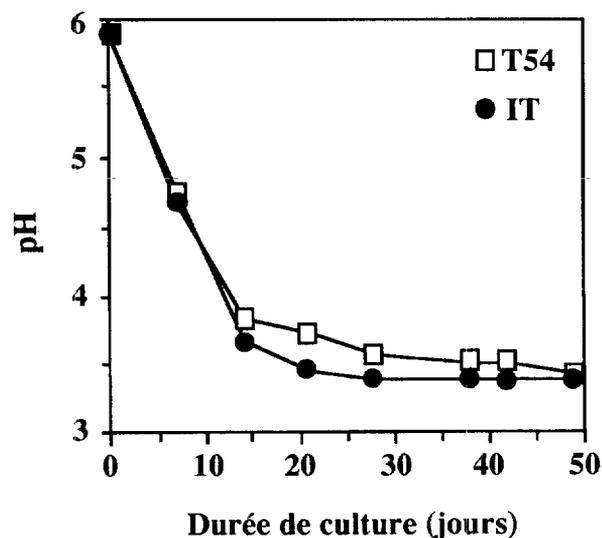


Figure 5. Évolution du pH du milieu M1 au cours de la culture. Le pH initial du milieu est ajusté à 5,9.

moitié du mycélium total est produite, le pH du milieu est proche de 3,5 ; cette valeur reste ensuite constante jusqu'à l'arrêt de la croissance. Quelle que soit la souche considérée, la croissance mycélienne conduit à l'acidification du milieu de culture.

Croissance en fonction du pH du milieu

La recherche du pH optimal pour le développement mycélien a été entreprise en étudiant la croissance de trois souches (IT,T54,GD) sur des milieux dont le pH varie entre 4 et 8. Les souches étudiées sont représentatives des trois groupes phénotypiques et des trois vitesses de croissance déterminées précédemment sur milieu gélosé. Quelle que soit la souche testée, la quantité de mycélium récolté après 21 j de culture n'est pas affectée par le pH initial du milieu (valeurs non présentées). Il est à noter en outre que la valeur finale du pH du milieu s'établit entre 3,3 et 4 quelle que soit la valeur initiale (figure 6). L'intensité du processus d'acidification est ainsi différente selon le pH initial, sans que ceci ne soit corrélé à la quantité de mycélium produit.

Analyse du milieu de culture après développement mycélien

Suite à l'acidification du milieu par le mycélium en croissance, des analyses ont été réalisées afin de déceler la présence éventuelle de composés de nature acide dans le milieu. Pour faciliter ces analyses, une étude a été faite sur un milieu simplifié à base de glucose (pH initial = 6). Cette étude montre tout d'abord que la croissance mycélienne ainsi que l'évolution du pH du milieu glucose (20 g/litre) présentent les mêmes caractéristiques que lors de l'étude sur le milieu complet M1. Ainsi, une chute du

pH jusqu'à une valeur constante d'environ 3,5 est enregistrée pendant 14 j de croissance. Le milieu de culture est alors récupéré et analysé par chromatographie sur papier. Cependant, celle-ci ne permet pas de visualiser la présence d'acides organiques, pas plus que l'analyse de la composition du milieu par des techniques aussi précises que la RMN du carbone 13 ou encore la CLHP (en utilisant une colonne spéciale pour sucres et acides organiques).

Effet de la durée d'incubation sur la production de carpophores

L'étude porte sur deux souches (GD et WH) qui, si elles appartiennent à des groupes phénotypiques différents, présentent les mêmes exigences de température pour la croissance mycélienne in vitro (cf. souches à vitesse de croissance intermédiaire, figure 3). L'augmentation de la durée d'incubation entraîne un retard sur le début de la fructification pour les deux souches étudiées (figure 7). Pour la souche blonde (GD), la première période de récolte (= volée) s'étend de la septième à la neuvième semaine lorsque l'incubation initiale est de 3 semaines. Cette volée débute 2 semaines plus tard lorsque l'incubation dure 4 semaines. Pour la souche brune (WH), les résultats sont encore plus marqués. L'allongement d'une semaine pour la période d'incubation se traduit par un retard de plus de 4 semaines dans la fructification.

Concernant le rendement, l'augmentation de la durée d'incubation pour la souche GD n'a pas d'effet significatif sur la quantité et la masse de carpophores récoltés après 19 semaines de culture (180 à 200 g/kilo de substrat lardé). Cependant, la récolte de première volée est beaucoup plus

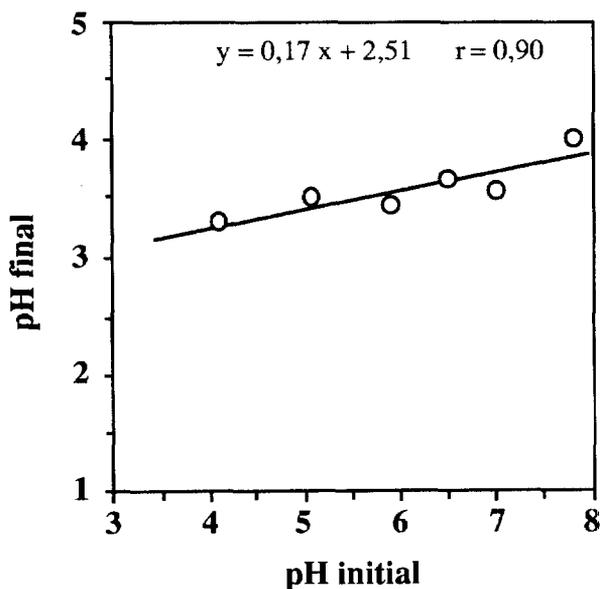


Figure 6. Variation du pH du milieu M1 en fonction du pH initial. Le pH final est mesuré après 21 j de culture.

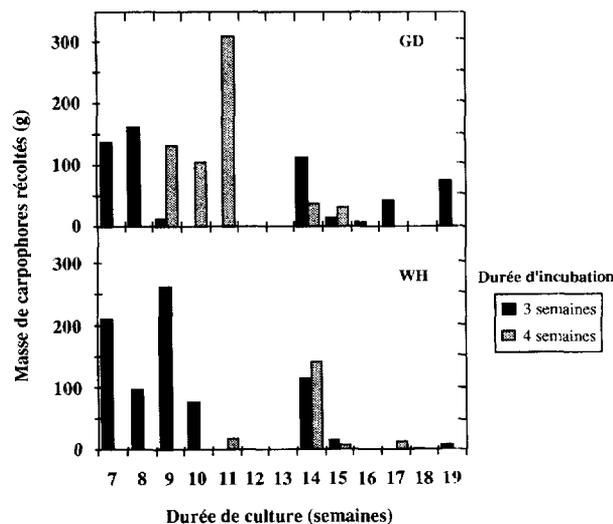


Figure 7. Effet de la durée d'incubation sur la formation de carpophores au cours de la culture de deux souches de strophaire.

La masse (g) de carpophores récoltés est mesurée pour un essai constitué de six barquettes de substrat, soit 3 300 g.

importante (+74 %) après 4 semaines d'incubation (récolte totale : 530 g), comparée à la récolte qui suit une incubation de 3 semaines (récolte totale : 310 g). On observe l'inverse pour la récolte de deuxième volée. Pour la souche WH, de fortes différences de rendement apparaissent lorsque la période d'incubation augmente. La fructification tardive induite par l'allongement de cette période est caractérisée par des carpophores de petite taille, conduisant à un rendement très faible. Ainsi, en fin de culture, les rendements sont de 225 g/kg et 60 g/kg pour des périodes d'incubation de 3 et 4 semaines respectivement.

Discussion

L'étude menée en microscopie électronique à balayage du basidiomycète a permis de préciser les caractéristiques anatomiques de l'espèce cultivée, venant ainsi compléter des observations faites précédemment à partir de carpophores de strophaire découverts dans le sud de la France [14, 15]. Toutefois, cette description morphologique ne semble pas corroborer la variabilité phénotypique observée au sein de l'espèce.

La germination de spores de *Stropharia rugoso-annulata* n'avait jusqu'à présent jamais été obtenue en laboratoire. Parmi les différentes conditions testées, seul le mycélium en développement possède un effet stimulateur sur la germination des spores. Une observation similaire avait été faite chez le champignon de couche *Agaricus bisporus* [16]. Cette stimulation serait due à un métabolite volatil diffusant à travers le milieu de culture et la germination peut être obtenue artificiellement, pour cette espèce, par l'addition d'acide isovalérique dans le milieu. Cette observation suscite beaucoup d'interrogations sur l'effet stimulateur du mycélium de strophaire. Cet effet stimulateur serait-il dû aux enzymes extracellulaires produites par le mycélium en croissance ? L'acidification du milieu, suite au développement mycélien, est-elle l'agent responsable du déclenchement de la germination ? Sur ce dernier point, il faut noter qu'une acidification du milieu jusqu'à un pH 4 par l'addition d'HCl ne permet pas de déclencher la germination des basidiospores.

L'optimum de croissance du mycélium, déterminé auparavant pour une seule souche de strophaire [6, 17], a été recherché ici pour l'ensemble des souches rassemblées. Nous avons ainsi décelé des différences dans les vitesses de croissance mycéliennes, conduisant à la formation de trois groupes de souches indépendamment des groupes phénotypiques. La connaissance des exigences thermiques de chacune des souches permettra d'adapter le choix de la souche aux conditions environnementales. En comparaison avec d'autres espèces cultivées, cette courbe de croissance est proche de celle obtenue pour des espèces d'*Agaricus* sp., mais le strophaire présente une vitesse de croissance plus forte, plus favorable à un envahissement rapide des substrats spécifiques. Il est à noter qu'un développement mycélien peut encore être

obtenu à 35 et 40 °C pour le strophaire alors qu'à partir de 30 °C, la plupart des espèces mésophiles cultivées atteignent le seuil de température létale. Seules des espèces adaptées aux climats tropicaux, telles que *Coprinus fimetarius* ou *Volvariella volvacea*, présentent encore une croissance au-delà de 30 °C [18]. La plus grande résistance in vitro de *Stropharia* aux excès de température suggère qu'il serait moins exigeant en climatisation que d'autres espèces cultivées, notamment l'agaric. Cela reste néanmoins à vérifier dans le substrat de culture.

Chaque espèce est affectée de façon différente par le pH du milieu dans lequel elle se développe. Ainsi, chez le pleurote, la croissance en milieu liquide est ralentie lorsque le pH est d'environ 4 ou supérieur à 6. En général, le champignon tend à modifier son milieu de telle sorte que le pH de celui-ci devienne proche du pH optimal de développement mycélien [19]. Ce pH optimal pourrait être lié aux exigences d'enzymes produites lors de la croissance. Au cours de la croissance du mycélium de strophaire en milieu liquide, le pH du milieu (initialement compris entre 4 et 8) diminue rapidement jusqu'à une valeur proche de 3,5. Ce phénomène a également été enregistré dans le substrat solide envahi par le mycélium. Les tentatives ayant pour but d'identifier l'origine de cette acidification se sont révélées infructueuses. Il semble que la diminution importante du pH du milieu au cours de la croissance du mycélium soit due à un efflux massif de protons dans ce milieu. Parmi les champignons cultivés, seul le shiitake (*Lentinula edodes*) possède une telle capacité d'acidification du milieu de culture. Chez ce champignon, un pH compris entre 3,5 et 4,5 est favorable à la formation des primordia ainsi qu'au développement des fructifications [20]. Chez le strophaire, ce phénomène d'acidification du milieu pourrait donc être un élément important en faveur de l'induction de la fructification du champignon. De plus, il permet sans aucun doute de protéger les hyphes contre les agents bactériens. Cependant, nous n'avons jamais pu obtenir d'ébauches de primordium à partir de cultures en conditions stériles sur milieu liquide ou gélosé. Ceci indique que, malgré l'acidification du milieu, toutes les conditions ne sont pas encore réunies pour induire la fructification.

Un essai de culture a été lancé avec deux souches (GD et WH) présentant in vitro une croissance mycélienne semblable. L'augmentation de la durée d'incubation du mycélium de ces deux souches au sein du substrat se traduit globalement par un retard dans la fructification et la récolte. La souche blonde (GD), moins affectée par l'allongement de cette incubation, se distingue de la souche (WH) par une fructification plus précoce. Une longue durée d'incubation semble provoquer chez cette souche une meilleure maturation du mycélium. Ceci conduit à un rendement élevé, compatible avec un arrêt de la culture après la première volée (environ 12 semaines). Au contraire, la souche WH est très affectée par l'allongement de la période d'incubation. Celui-ci conduit à une récolte de petits carpophores, économiquement inintéressante.

Des essais complémentaires sont en cours afin de préciser les conditions trophiques indispensables à la fructification du strophaire. Ces essais devraient en outre

permettre d'optimiser la récolte de première volée, très intéressante en termes de rendement et conduisant à une rotation accélérée des cultures.

ABRIDGED VERSION

Worldwide interest in mushroom cultivation is increasing and the diversification of European production has become necessary. Among higher fungi, *Stropharia rugoso-annulata* may contribute to this diversification. A few years ago, investigations were initiated in our laboratory with the aim of evaluating the natural diversity in this cultivated species. Fourteen strains were collected from different research groups in Europe and characterized through protein and isozyme composition, and investigations on anatomy and physiological characteristics of the basidiomycete were carried out. In addition, a preliminary cultivation trial was undertaken. We report here the results of this work.

A scanning electron microscopy analysis of *Stropharia* strains revealed no significant morphological differences, regardless of the phenotypic variability. Spore germination could only be obtained in the presence of growing mycelium, resulting in a germination rate of 15.3%.

The study of the effect of temperature on the growth rate of *Stropharia* mycelium led to the determination of three groups of strains, fast-, medium- and slow-growing strains. This growth-based classification appeared to be independent of

that based on phenotypes or protein patterns. However, some similar traits were found among the strains: the higher growth rate was recorded at 25 °C, and a residual growth still occurred at temperatures higher than 35 °C. The latter was rather unusual within mesophilic species.

Within the range 4 to 8, the pH of the medium did not appear to modify mycelium development. In addition, after 2 weeks of mycelium growth, this pH was established at a value close to 3.5. This value did not depend on the initial pH value. However, no acidic compounds were detected in the medium, suggesting that a strong proton efflux occurred during mycelium development. The mechanisms underlying this acidification and its benefit for the growing mushroom are discussed.

A preliminary cultivation trial, aimed at identifying the optimal conditions for mycelium fructification, was carried out. It indicated that an increase in the spawn run time resulted in a delay in carpophore formation, as well as in a strong drop in mushroom production. This work is a first step towards the establishment of a performing strategy for the production of the edible mushroom *Stropharia rugoso-annulata*.

Remerciements : Nous remercions J.-M. Olivier (Inra Bordeaux, France) pour ses commentaires pertinents concernant ce travail.

RÉFÉRENCES

1. Puschel J. 1969. Der Riesentrüschling, ein neuer Kulturpilz Champignonanbau. *Dtsch. Gärtnereipost* 19, 6-8
2. Lelley J., Schmaus F. 1976. Der Rotbraune Riesentrauschling. In : *Pilzanbau* (Ulmer E., ed.), Stuttgart, 235-242
3. Vessey E. 1973. Culture industrielle et familiale du *Stropharia rugoso-annulata* Farlow ex Murrill en Hongrie. *Rev. Mycol.* 38, 172-184
4. Balazs S. 1974. *Stropharia* growing problems in Hungary. *Rep. Veg. Crops Res. Inst. Kecskemet*, Hongrie
5. Staneck M. 1974. State of production and research of edible fungi. *Int. Symp. Czech. Mycol. Soc.*, Prague, République tchèque
6. Zadrazil F., Schliemann J. 1975. Ein Beitrag zur Ökologie und Anbautechnik von *Stropharia rugoso-annulata* (Farlow ex Murrill). *Der Champignon* 163, 7-22
7. Szudyga K. 1978. *Stropharia rugoso-annulata*. In : *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (Chang S.T., Hayes W.A., eds.), Academic Press, New York, 559-571
8. Lelley J. 1980. Biotechnologische Untersuchungen über die Fruktifikation von *Stropharia rugoso-annulata*. *Mitteilungen der Versuchsanstalt für Pilzanbau der Landwirtschaftskammer, Rheinland-Krefeld*, 4, 33-50
9. Carette J. 1986. Intensivering van de teelt van *Stropharia rugoso-annulata* (Farlow ex Murrill). Faculteit van de Landbouwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent, Belgique
10. Poppe J., Sedeyn P. 1987. Substrate additives for earlier and double production of *Stropharia rugoso-annulata*. *Mush. Sci.* 12, 503-508
11. Bonenfant-Magné M., Magné C., Eshault M.A., Lemoine C. 1997. Characterization of cultivated strains of a new edible mushroom: *Stropharia rugoso-annulata*. I. Protein variability. *Crypt. Mycol.* (in press)
12. Bonenfant M. 1993. Le strophaire : caractérisation de souches et influence de certaines conditions écologiques sur sa fructification. Thèse de doctorat, université de Rennes-I, Rennes, France
13. Raper C.A., Raper J.R. 1972. Genetic analysis of life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycol.* 64, 1088-1117
14. Guinberteau J. 1978. Découverte dans le sud-ouest du *Stropharia rugoso-annulata* (Farlow ex Murrill) = *Stropharia ferrii* (Bres). *Doc. mycol.* IX (34), 33-39
15. Lamoure D. 1984. A propos d'une forme pâle de *Stropharia rugoso-annulata* (Farlow ex Murrill). *Bull. Soc. Linn. Lyon*, 53, 294-296
16. Losel D.M. 1964. The stimulation of spore germination in *Agaricus bisporus* by living mycelium. *Ann. Bot.* 28, 541-554
17. Balazs S., Szabo I. 1978. Untersuchungsergebnisse über den Wärmebedarf einiger, neuerlich in Kultur genommener Pilzarten. *Mush. Sci.* 10, 421-427
18. Zadrazil F., Grabbe K. 1983. Edible mushrooms. In : *Biotechnology* (Rehm H.J., Reed G., eds.), Weinheim, Verlag Chemie, 145-187
19. Zadrazil F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*. In : *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (Chang S.T., Hayes W.A., eds.), Academic Press, New York, 521-557
20. Tokimoto K., Komatsu M. 1978. Biological nature of *Lentinus edodes*. In : *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms* (Chang S.T., Hayes W.A., eds.), Academic Press, New York, 445-459