



## Culture de *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer sur substrat ligno-cellulosique en République Démocratique du Congo

Mwinyi Waziri, Lebisabo Bungamuzi, Kanyama Joseph, Rammeloo Jan, NshimbaSeya Wa Malale & Degreeef Jérôme

### Mwinyi Waziri :

Université de Kisangani, Faculté des Sciences, République Démocratique du Congo

Auteur correspondant : [kiumbewaziri@gmail.com](mailto:kiumbewaziri@gmail.com)

### Lebisabo Bungamuzi :

Université de Kisangani, Faculté des Sciences, République Démocratique du Congo

### Kanyama Joseph :

Université de Kisangani, Faculté de gestion des Ressources Naturelles Renouvelables, République Démocratique du Congo

### Rammeloo Jan : Jardin botanique de Meise, Belgique

### NshimbaSeya Wa Malale :

Université de Kisangani, Faculté des Sciences, République Démocratique du Congo

### Degreeef Jérôme : Jardin botanique de Meise, Belgique

Service général de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, Fédération Wallonie-Bruxelles, Belgique

DOI: [10.25518/2295-8010.1695](https://doi.org/10.25518/2295-8010.1695)

### Résumé :

Cette étude a concerné la culture sur pailles de riz et sciure de bois de *Gilbertiodendron dewevrei* de *Pleurotus tuber-regium*, espèce fongique tropicale appréciée pour sa saveur et ses propriétés médicinales. Les blancs ont été obtenus localement par isolement de spores de spécimens récoltés dans leur environnement naturel aux environs de Kisangani (RD Congo). La formation de sporophores est conditionnée à celle de sclérotés 14 jours au préalable. Trois poussées ont été enregistrées avec un rendement total de 42,25 % qui peut être considéré comme très satisfaisant et de loin supérieur au rendement économique de 20 % généralement reconnu pour qu'un substrat soit jugé approprié à la production de champignons.

### Abstract :

This study concerned the cultivation on rice straw and *Gilbertiodendron dewevrei* sawdust of *Pleurotus tuber-regium*, a tropical fungal species appreciated for its flavour and its medicinal properties. The spawns were obtained locally by isolating spores from specimens collected in their natural environment around Kisangani (DR Congo). The formation of sporophores is conditional to the formation of sclerotia 14 days beforehand. Three outbreaks were recorded with a total yield of 42.25 %, which can be considered very satisfactory and far above the generally accepted economic yield of 20 % for a substrate to be considered suitable for

mushroom production.

## Introduction

Les champignons sauvages comestibles jouent un rôle important dans la survie des populations rurales en Afrique tropicale. Ils sont particulièrement recherchés pour leur valeur nutritive élevée ainsi que leur valeur marchande, et près de 300 espèces y sont consommées par les populations locales (Rammeloo & Walley, 1993 ; FAO, 2006 ; De Kesel & Malaisse, 2010 ; Eyi *et al.*, 2011 ; Degreef & De Kesel, 2017). De nombreuses espèces de champignons sauvages sont récoltées au rythme d'apparition de leurs sporophores dans leur milieu naturel, généralement durant quelques semaines en période pluvieuse.

Des études taxonomiques permettent d'inventorier progressivement la diversité de ces champignons comestibles africains mais très peu de souches sauvages ont, jusqu'ici, fait l'objet d'essais de mise en culture, particulièrement en Afrique centrale (Degreef *et al.*, 2016 ; Diansambu *et al.*, 2015 ; Dibaluka *et al.*, 2010 ; Yongabi, 2014). *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer est une espèce comestible saprotrophe, dont le cycle de vie est associé au développement d'un sclérote souterrain globuleux qui peut atteindre jusqu'à 30 cm de diamètre. Ce caractère très rare chez les macromycètes en permet une identification immédiate et ne prête à aucune confusion. Bien que son rattachement au genre *Pleurotus* ait été confirmé par des études moléculaires (Hitoshi & Takao, 1995; Njouonkou, 2011), de nombreux auteurs persistent à maintenir l'espèce sous *Lentinus tuber-regium* Sing. (Zmitrovich & Kovalenko, 2016) en raison de ses caractères macroscopiques plus proches de ceux des lentins que des pleurotes, et notamment par la présence de tissus dimitiques. L'origine australasienne de *Pleurotus tuber-regium* a été révélée par l'étude phytogéographique d'Isikhuemhen *et al.* (2000).

Elle est ainsi rapportée d'Australie et de Papouasie-Nouvelle Guinée, mais également de Madagascar, d'Inde, du Sri Lanka, des Iles Salomon et de nombreux pays d'Afrique où elle est très appréciée comme aliment (Pegler, 1983).

En Afrique tropicale, l'espèce est signalée dans tous les types de forêts et dans les plantations, notamment au Bénin, au Burundi, au Cameroun, en République du Congo, en République démocratique du Congo, en Côte d'Ivoire, au Gabon, au Ghana, en Guinée, au Kenya, au Liberia, au Nigéria, en Ouganda, en Sierra Leone, en Tanzanie, au Tchad, en Zambie et au Zimbabwe (Degreef & De Kesel, 2017). Outre les qualités nutritionnelles du sporophore (Apetorgbor *et al.*, 2013 ; Okhuoya & Isikhuemhen, 1999), le sclérote est également utilisé à des fins thérapeutiques et est alors généralement réduit en poudre après séchage (De Kesel *et al.*, 2017 ; Eyi *et al.*, 2011 ; Isikhuemhen & Nerud, 1999).

Des études biochimiques ont ainsi mis en évidence la présence de composés actifs tels que des flavonoïdes, des phénols, différents alcaloïdes, des glycosides, des protéines et des enzymes dans le sclérote (Apetorgbor *et al.*, 2013 ; Chenghua *et al.*, 2000; Fasidi & Ekuere, 1993 ; Isikhuemhen & Nerud, 1999 ; Nwokolo, 1987 ; Wang & Ng, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001). Elles ont également révélé son intéressant pouvoir anti-oxydant (Sukumar *et al.*, 2018).

Au Nigéria, les médecins utilisent ces sclérotés pour la préparation d'un remède qu'ils administrent aux femmes enceintes afin d'aider le développement du fœtus (Oso, 1977). Au Ghana, ce même



sclérote est utilisé pour soulager les maladies liées à la malnutrition et à l'anémie chez les enfants (Isikhuemhen & Okhuoya, 1995). Le sclérote aurait également des pouvoirs coagulants et désinfectants (Chengua *et al.*, 2000 ; Yongabi *et al.*, 2011).

Un compte rendu ethnographique sur les bénéfices de la consommation de ce champignon a été publié par Baeke (2005). Le mycélium de *Pleurotus tuber-regium* aurait même la capacité d'améliorer les sols pollués aux hydrocarbures (Adenipekun, 2008 ; Isikhuemhen *et al.*, 2003).

Une technique empirique de culture de *Pleurotus tuber-regium* est pratiquée dans la plupart des pays où l'espèce est signalée. Elle consiste à repérer la présence de l'espèce aux sporophores qui émergent du sol, à creuser quelques dizaines de centimètres et à prélever le volumineux sclérote souterrain qui est alors ramené au village et généralement enterré dans un endroit frais, humide et ombragé (Zadrazil & Kurtzman, 1982).

Cette pratique culturelle a été adoptée avec succès par des chercheurs nigériens afin de maximiser la production de sporophores de *Pleurotus tuber-regium* en conditions contrôlées (Fasidi & Olorunmaye, 1994 ; Isikhuemhen & Okhuoya, 1995,1996; Oghenekaro *et al.*, 2008 ; Okhuoya & Etugo, 1993 ; Okhuoya & Okogbo, 1990, 1991 ; Okhuoya *et al.*, 1998). Elle présente néanmoins l'inconvénient majeur de faire dépendre la mise en œuvre de la culture de la disponibilité de sclérotés prélevés en milieu naturel et dont la capacité à fournir des sporophores diminue en cours de production en raison de l'épuisement de leurs ressources.

Par ailleurs, en déterrant un sclérote et en l'utilisant comme semence, aucune garantie n'est donnée au producteur que la productivité de cette souche sauvage sera intéressante. Pour faire face à ces contraintes, la présente étude a opté pour une technique d'isolement de souche de *Pleurotus tuber-regium* à partir de spores, suivie de la production de blanc de semis. Cette méthode présente l'avantage de permettre de sélectionner et de conserver sur milieu gélosé les souches les plus performantes, tant au niveau de la croissance mycélienne que de leur capacité à produire des quantités importantes de sporophores.

Une technique apparentée, consistant à prélever un fragment de sclérote pour produire du blanc de semis, a précédemment été adoptée lors d'une étude dont l'objectif principal était d'estimer la valeur nutritive des sporophores de *Pleurotus tuber-regium* (Apetorgbor *et al.*, 2013).

## **Matériel et Méthodes**

### **Isolement de la souche et mise en culture**

Un sporophore frais (spécimen P0252019Kis conservé en herbier à l'Université de Kisangani) a servi de matériel de référence pour l'obtention de spores. Un fragment du chapeau du spécimen frais est prélevé et fixé à l'ouverture d'un tube à essai à l'aide de ruban Parafilm, face hyméniale dirigée vers le milieu de culture PDA (filtrat de cuisson de 200 g de pommes de terre + 20 g d'agar-agar + 20 g de dextrose porté à 1 l et dilué dans 1 l d'eau déminéralisée) (Dibaluka, 2005) (Figure 1). Le tube est mis à incuber à l'obscurité et à température ambiante durant 12 à 14 jours jusqu'à envahissement complet du milieu gélosé par le mycélium.



**Figure 1 : Isolement de souche à partir d'une sporée**

Le substrat de semis est préparé à partir de grains de sorgho traités comme suit : nettoyage à l'eau propre, cuisson (15 min), égouttage, ajustement du pH voisin de la neutralité avec de la chaux éteinte (2 %), répartition du milieu (300 g) dans des bocaux fermés par un tampon d'ouate placé sous un couvercle vissé, stérilisation à l'autoclave (120°C, 1 h, 1 atm).

L'inoculation du substrat de semis avec le mycélium de la culture pure prélevé sur milieu gélosé est réalisée dans des conditions de stricte asepsie sous flux laminaire, à côté d'une flamme à gaz.

L'incubation des grains de sorgho est menée dans une armoire aérée à l'obscurité (27-29°C, 15 jours).

Le substrat de fructification constitué de pailles de riz et de sciure de bois de *Gilbertiodendron dewevrei* est préparé et mis à tremper dans l'eau pendant 24 h. Il est ensuite égoutté et mis à fermenter sous bâche pendant 10 jours, puis composté pendant 30 jours. La teneur en eau du substrat de fructification avoisine alors 65 %.



**Figure 2 : Ballots fructifères avec anneau de 3 cm à l'encolure bouché d'ouate et couvert de papier aluminium.**

La confection des ballots de fructification est réalisée par remplissage de sacs en plastique thermorésistants et doublés (19 × 28 cm) contenant 600 g de substrat (figure 2) dont la composition est donnée au tableau 1. Les sacs sont ensuite pasteurisés à l'autoclave à 120°C pendant 1 h 20 min sous une pression de 1 atm.

**Tableau 1 : Composition des substrats de fructification des ballots fructifères**

Substrat	Poids (g)	Proportion (%)
paille de riz	6000	68
sciure de bois	1200	20
son de riz	600	10
Gypse	120	2

Le lardage du substrat est réalisé 24 h après pasteurisation, en conditions aseptiques sous flux laminaire, à raison d'une cuillère à café de blanc de semis par ballot de fructification. Les ballots sont ensuite incubés dans des armoires à température ambiante (28°C) et dans l'obscurité. L'uniformisation des conditions d'incubation est assurée par un déplacement aléatoire des ballots à l'intérieur de l'armoire, deux fois par semaine. L'incubation se poursuit avec l'envahissement

total du substrat de production par le mycélium suivi de l'apparition des sclérotés. La technique du gobetage est utilisée pour la phase de production. Les ballots de fructification contenant les sclérotés sont incisés et placés dans des caisses en bois puis enfouis sous de la terre meuble.

## **Analyse des données**

La vitesse de croissance du mycélium est estimée par mesurage, à l'aide d'une règle graduée, de l'envahissement du milieu de culture. Elle est calculée sur le milieu de culture gélosé, sur le substrat de semis ainsi que sur le substrat des ballots de fructification.

La production de 17 ballots de fructification est évaluée par pesée du poids frais des sporophores produits par ballot lors de chacune des trois levées successives. L'analyse pour la comparaison des moyennes est réalisée sur les données des trois levées. Le rendement de production est estimé en pourcentage du poids total de sporophores frais obtenu par rapport au poids total de substrat des ballots de fructification.

Un test ANOVA est utilisé pour comparer les moyennes de production et un test de Tukey pour réaliser une comparaison multiple des moyennes.

## **Résultats**

### **Croissance du mycélium**

La vitesse moyenne de croissance du mycélium est de  $0,24 \pm 0,11$  cm/jour sur milieu PDA, de  $0,75 \pm 0,29$  cm/jour sur le substrat de semis constitué de grains de sorgho et de  $0,90 \pm 0,33$  cm/jour sur le substrat des ballots de fructification.

### **Productivité en sporophores**

L'envahissement complet des ballots de fructification par le mycélium est observé après 27 jours d'incubation. Quatorze jours s'écoulent ensuite avant la formation des sclérotés. La première levée survient 10 jours après la mise en terre des ballots fructifères contenant les sclérotés (Figure 3). La récolte est réalisée 3 à 4 jours après l'apparition des sporophores car ceux-ci deviennent rapidement coriaces et leur appétence en est diminuée. Deux autres levées se succèdent à un intervalle d'environ 30 jours.



**Figure 3 : Production de sporophores de *Pleurotus tuber-regium* par technique de gobetage**

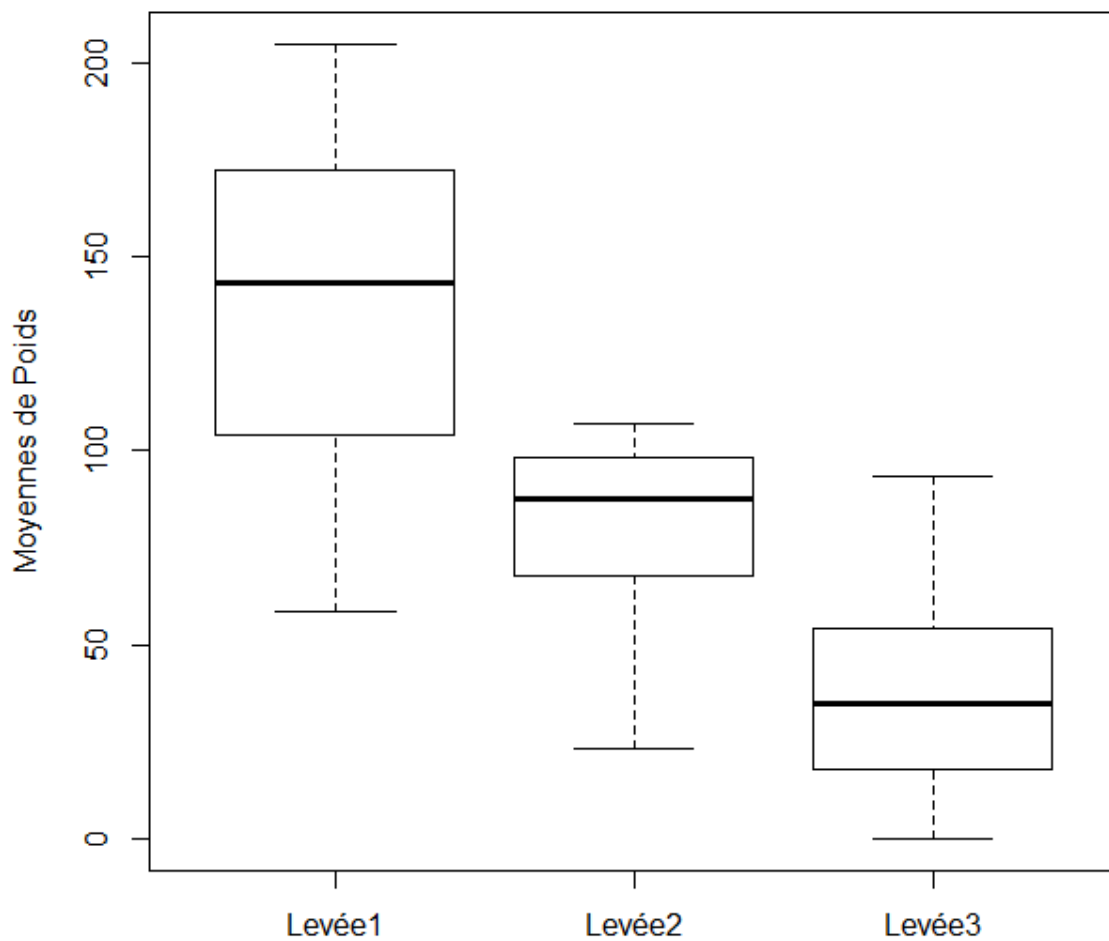
La productivité en sporophores est détaillée au tableau 2.

**Tableau 2 : Productivité en sporophores (g) de 17 ballots de 600 g chacun**

	Levée 1	Levée 2	Levée 3
Poids total (g)	2354,4	1317	638,6
Poids moyen (g) par ballot	138,49 ± 45,90	77,47 ± 28,33	37,56 ± 24,88
Rendement (%)	23,08 ± 0,55	12,91 ± 0,31	6,26 ± 0,15

À l'issue des trois levées, les 17 ballots de fructification de 600 g (soit 10.200 g de substrat) ont produit un total de 4310 g de sporophores frais, soit un rendement total de 42,25 %.

Le poids le plus élevé est enregistré lors de la première levée et diminue ensuite jusqu'à l'épuisement du substrat. Le rendement par levée est obtenu en divisant le poids total de sporophores produits par le poids total du substrat. La comparaison des poids moyens obtenus par levée est illustrée dans la figure 4.



**Figure 4 : Evolution du poids moyen en sporophores (g) par ballot au cours de la production.**

Les tests de comparaison multiple des moyennes de production et des rendements de chaque levée révèlent qu'elles diffèrent significativement les unes des autres ( $p < 0,05$ ), notamment en raison de l'épuisement du milieu, au fur et à mesure de la production.

## Conclusion

La méthode de fructification de *Pleurotus tuber-regium* à partir de blanc de semis (obtenu non à partir de sclérotés mais par isolement de spores de spécimens récoltés dans leur environnement naturel) a donné des résultats prometteurs. Cette méthode ainsi que les résultats obtenus ouvrent des perspectives quant à la possibilité de sélectionner, en Afrique tropicale, des souches performantes de *Pleurotus tuber-regium* pour la mise en culture. Cet essai préliminaire, limité à une souche sauvage isolée dans les environs de Kisangani en République démocratique du Congo, a en effet démontré une vitesse de croissance du mycélium importante et des rendements de





production en sporophores encourageants. Le rendement total de 42,25 % obtenu à l'issue de notre expérimentation peut en effet être considéré comme très satisfaisant et de loin supérieur au rendement économique de 20 % généralement reconnu pour qu'un substrat soit jugé approprié à la production de champignons (Dibaluka *et al.*, 2010 ; Oei, 2016). La réussite de la culture de *Pleurotus tuber-regium* apparaît très dépendante du choix du substrat comme en témoignent les échecs enregistrés sur feuilles de jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*) et pailles de millet (*Eleusine coracana*) (Apetorgbor *et al.*, 2013). Le mélange de riz paddy et de sciure de bois utilisé dans le présent essai constitue une alternative aux feuilles de bananier plantain ou à la sciure de bois compostée (*Triplochiton scleroxylon*) qui assurent également une production de sporophores de cette espèce (Apetorgbor *et al.*, 2013). L'enjeu est désormais de réduire les délais entre les levées à travers une sélection de souches de diverses origines.

## Remerciements

Le premier auteur remercie le Projet VLIR-UOS pour l'appui financier dans la réalisation de ce projet, les différentes formations en mycologie et algologie dont il a bénéficié ainsi que le soutien dans sa participation à différents symposiums sur la mycologie.

## Bibliographie

1. Apetorgbor A.K., Dzomeku M. & Apetorgbor M.M. (2013) Growth factors and cultivation of *Pleurotus tuber-regium* on selected plant wastes. *International Food Research Journal* 20(6): 3387-3393
2. Chenghua D., Xiangliang Y., Xiaoman G., Yan W., Jinggyan Z. & Huibi X. (2000) A  $\beta$ -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Carbohydrate Research* 328: 629-633.
3. Degreef J. & De Kesel A. (2017) The Edible Fungi of Tropical Africa annotated database [www.EFTA-online.org - accessed 15/05/2020]
4. Degreef J., Demuyneck L., Mukandera A., Nyirandayambaje G., Nzigidahera B. & De Kesel A. (2016). Wild edible mushrooms, a valuable resource for food security and rural development in Burundi and Rwanda. *Biotechnology Agronomy Society Environment* 20(4): 441-452.
5. De Kesel A. & Malaisse F. (2010). Edible Wild food: Fungi. In: Malaisse F. (ed.), *How to live and survive in Zambezian Open Forest (Miombo Ecoregion)*. Gembloux (Belgium) : Presses Agronomiques de Gembloux : 41-56.
6. Diansambu M.I., Dibaluka M.S., Lumande K.J. & Degreef J. (2015) Culture de trois espèces fongiques sauvages comestibles du Groupement de Kisantu (RD Congo) sur des substrats ligno-cellulosiques compostés. *Afrique Science* 11(3) : 241-261.
7. Dibaluka M.S., Lukoki F.L., De Kesel A. & Degreef J. (2010) Essais de culture de quelques champignons lignicoles comestibles de la région de Kinshasa (R.D. Congo) sur divers substrats lignocellulosiques. *Biotechnology Agronomy Society Environment* : 417-422.
8. Dibaluka M.S. (2005) Inventaire des macromycètes de la forêt de lac de Ma

Vallée(Kinshasa) et essai de mise en culture des quelques espèces comestibles, Mémoire (DEA) inédit, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, 75p.

9. EyiNdong H., Degreef J. & De Kesel, A. (2011) Champignons comestibles des forêts denses d'Afrique centrale, Taxonomie et identification, *Abc Taxa* 10, 254p.
  10. FAO (2006) Champignons comestibles sauvages. Vue d'ensemble sur leurs utilisations et leur importance pour les populations. Rome, Italie, 170p.
  11. Fasidi I.A. & Ekuere U.U. (1993) Studies on *Pleurotus tuber-regium*: Cultivation, proximate composition and mineral content of sclerotia. *Food Chemistry* 48: 255- 258.
  12. Hitoshi N. & Takao N. (1995) Phylogenetic analysis of *Pleurotus* based on data from partial sequences of 18rDNA and ITS-1 regions. *Mushroom Science* 14: 161-168.
  13. Isikhuemhen O.S. & Nerud F. (1999) Preliminary studies on the ligninolytic enzymes produced by the tropical fungus *Pleurotus tuber-regium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 257-260.
  14. Isikhuemhen O. S. & Okhuoya J. A. (1995) A low cost technique for the cultivation of *Pleurotustuberregium* (Fr.) Singer in developing tropical countries. *Mushroom Growers Newsletter* 4, 2-4.
  15. Isikhuemhen O.S. & Okhuoya J.A. (1996) Cultivation of edible sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Singer on agricultural wastes. In D.J. Royse (ed.): *Proceedings of the 2nd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 9-12 June 1996: 429-436. Pennsylvania State University, USA.
  16. Isikhuemhen O.S., Moncalvo J.M., Nened F. & Vilgalys R. (2000) Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotustuberregium*. *Mycological Research*. 104: 732-737.
  17. Njouonkou A.L. (2011) Taxonomie, systématique et étude phylogénétique des genres *Lentinus* Fr. et *Pleurotus* (Fr.) Kramer au Cameroun basée sur la morphologie et les séquences des régions ITS de l'ADNr et identification des enzymes extracellulaires oxydases de quelques champignons lignivores. Thèse de Doctorat, Université de Yaoundé I, 198 p.
  18. Nwokolo, E. (1987). Composition of nutrients in the sclerotium of the mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Plant Foods and Human Nutrition* 37: 133-139.
  19. Oei P. (2016). *Mushroom cultivation*. 4<sup>th</sup> edition. Eco Consult Foundation, The Netherlands, 520 p.
  20. Oghenekaro A.O., Okhuoya J.A. & Akpaja E.O. (2008) Growth of *Pleurotustuberregium* (Fr.) Singer on some heavy metal-supplemented substrates. *African Journal Microbiology Research* 2:268-271.
  21. Okhuoya J.A. & Isikhuemhen O.S. (1999) Mushroom cultivation: The Nigerian Experience. In. A. Broderick, T. Nair. (Eds.) *Proceedings of the 3rd International conference on*
-



- Mushroom Biology and Mushroom Products & AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference. October 12-16, 1999. Sydney: 380-389.
22. Okhuoya J.A. & Etugo J.E. (1993) Studies on the cultivation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing., an edible mushroom. *Bioresource Technology* 44:1-3.
  23. Okhuoya J.A. & Okogbo F.O. (1990) Induction of edible sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* in the laboratory. *Annals of Applied Biology* 117: 295-298.
  24. Okhuoya J.A. & Okogbo F.O. (1991) Cultivation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. on various farm wastes. *Proceedings of Oklahoma Academy of Science* 71: 1-3.
  25. Okhuoya J.A., Isikhuemhen O.S. & Evue G.A. (1998) *Pleurotustuberregium*(Fr.) Sing.: Sclerotia and sporophore yield during cultivation on sawdust of different woody plants. *The International Journal of Mushroom Science* 2 (2): 41-46.
  26. Oso B.A. (1977) *Pleurotus tuber-regium* from Nigeria. *Mycologia* 69:272-279.
  27. Pegler D.N. (1983) The genus *Lentinus*: a world monograph. HMSO, London.
  28. Rammeloo J. & Walley R., (1993). The edible fungi of Africa south of the Sahara: a literature survey. *Scripta Botanica Belgica* 5: 1-62
  29. Sukumar D., Mnoj K., Rakesh R. & Manoranjan P.S. (2018) *Pleurotus tuber-regium* (Rumph. ex Fr.) Singer a potent source of antioxidant. *Balneo Research Journal* 9(3): 228-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.12680/balneo.2018.186>
  30. Wang H.X. & Ng T.B. (2001) Isolation of pleutereglin, a novel ribonuclease-inactivating protein from the sclerotia of the edible mushroom *Pleurotustuberregium*. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 288:718-721.
  31. Yongabi K.A. (2014). Current development in mushroom biotechnology in sub-Saharan Africa. *Bulletin of the World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products* 11: 4-13.
  32. Zhang M., Cheung P.C.K. & Zhang L. (2001) Evaluation of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer as a potential antitumour agent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:5059-5062.
  33. Zmitrovich I.V. & Kovalenko A.E. (2016) Lentinoid and polyporoid fungi, two generic conglomerates containing important medicinal mushrooms in molecular perspective. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 18(1):23-38.