

Effet de phytohormones exogènes sur l'évolution de certains paramètres biochimiques au cours de l'embryogenèse somatique de *Ricinodendron heudelotii* Baill.

FOTSO^{a*}, Tchinda Nehemie DONFAGSITELI^b, SANONNE^a, Ndoumou Denis OMOKOLO^a

^a Laboratoire de Physiologie Végétale, Département des Sciences Biologiques, École Normale Supérieure, BP 47, Yaoundé, Cameroun
fotsobier@yahoo.fr

^b Laboratoire de Botanique et de Médecine Traditionnelle, Institut de Recherches Médicales et d'Études des Plantes Médicinales, BP 6163, Yaoundé, Cameroun
donfagsiteli@yahoo.fr

Effect of exogenous phytohormones on the evolution of certain biochemical parameters during the somatic embryogenesis of *Ricinodendron heudelotii* Baill.

Abstract — Introduction. To introduce *Ricinodendron heudelotii* (Euphorbiaceae) into agro-systems, plantlets with a taproot system can be obtained by *in vitro* somatic embryogenesis. We studied the effect of some exogenous phytohormones on certain biochemical parameters characteristic of the species' somatic embryogenesis. **Materials and methods.** Somatic calli and embryos were induced by culture of leaf fragments on a basic medium enriched by (1, 2 or 3) mg 2,4-D·L⁻¹ or by combinations of [2,4-D / kinetin] or [2,4-D / BAP] implying hormones with various concentrations. Extractions and analyses of total sugars, phenols, total proteins and peroxidase activity were carried out after (30, 50 and 70) d of callus development. **Results.** After 30 d of culture, the best percentages of explants forming calli varied from 72,1% to 100% according to the phytohormones used. After 50 d, these calli formed globular accumulations of cells in division (embryonic nodules). After 70 d, 17,4% among the calli differentiated multiform somatic embryos in the presence of 3 mg 2,4-D·L⁻¹; 23,1%, in the presence of [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg kinetin·L⁻¹] and 27,6%, in the presence of [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 2 mg BAP·L⁻¹]. The sugar content was highest at 30 d (callus formation) and 50 d (embryonic nodule formation on calli), whereas the phenol and protein contents, and the peroxidase activity, were higher at 70 d (somatic embryo differentiation on calli).

Discussion and conclusion. Following the example of what occurs in other plant species, in *R. heudelotii*, the exogenous phytohormones would operate in the metabolism control of the biochemical parameters implied in the somatic embryo formation and development.

Cameroon / *Ricinodendron heudelotii* / micropropagation / callogenesis / somatic embryos / plant growth substances / carbohydrate content / phenolic content / protein content / peroxidases

Effet de phytohormones exogènes sur l'évolution de certains paramètres biochimiques au cours de l'embryogenèse somatique de *Ricinodendron heudelotii* Baill.

Résumé — Introduction. Pour introduire *Ricinodendron heudelotii* (Euphorbiacée) dans les agrosystèmes, des plantules ayant un système racinaire pivotant peuvent être produites par embryogenèse somatique *in vitro*. Nous avons étudié l'effet de quelques phytohormones exogènes sur certains paramètres biochimiques caractéristiques de l'embryogenèse somatique de l'espèce. **Matériel et méthodes.** Des cals et des embryons somatiques ont été induits par culture de fragments de feuilles sur un milieu de base enrichi en (1, 2 ou 3) mg 2,4-D·L⁻¹ ou de combinaisons [2,4-D / kinétine] ou [2,4-D / BAP] impliquant différentes concentrations des hormones. Les extractions et analyses des sucres totaux, phénols, protéines totales et activité des peroxydases ont été faites après (30, 50 et 70) j de développement des cals. **Résultats.** Après 30 j de culture, les meilleurs pourcentages d'explants formant des cals ont varié de 72,1 % à 100 % selon les phytohormones utilisées. Après 50 j de culture, ces cals ont formé des amas globulaires de cellules en division (nodules embryonnaires). Après 70 j de culture, 17,4 % des cals ont différencié les embryons somatiques multiformes en présence de 3 mg 2,4-D·L⁻¹; 23,1 %, en présence de [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg kinétine·L⁻¹] et 27,6 %, [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 2 mg BAP·L⁻¹]. La teneur en sucres a été la plus élevée à 30 j (formation des cals) et 50 j (formation des nodules embryonnaires sur cals), alors que les teneurs en phénols, en protéines et l'activité des peroxydases ont été plus élevées à 70 j (différenciation des embryons somatiques sur cals). **Discussion et conclusion.** À l'instar de ce qui se passe chez d'autres espèces végétales, chez *R. heudelotii*, les phytohormones exogènes interviendraient dans le contrôle du métabolisme des paramètres biochimiques impliqués dans la formation des embryons somatiques et de leur développement.

Cameroon / *Ricinodendron heudelotii* / micropropagation / callogenèse / embryon somatique / substance de croissance végétale / teneur en glucides / teneur en phénols / teneur en protéines / peroxydase

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 5 octobre 2006
Accepté le 10 avril 2007

Fruits, 2007, vol. 62, p. 303–315
© 2007 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits:2007026
www.fruits-journal.org

RESUMEN ESPAÑOL, p. 315

1. Introduction

Ricinodendron heudelotii (Euphorbiacée) est une plante ligneuse rencontrée dans les zones forestières humides d'Afrique tropicale. L'arbre fait partie des plantes à usages multiples. En particulier, ses amandes oléagineuses sont récoltées par les populations pour la consommation et la commercialisation [1, 2].

Dans le processus de domestication (introduction dans les agrosystèmes) de cette espèce, les stratégies de régénération qui ont été mises en œuvre portent principalement sur le bouturage [3] (80 % de réussite) et le greffage [4] (moins de 10 % de réussite). Les plantes régénérées par bouturage présentent un système racinaire étalé. La micropropagation *in vitro* constitue une autre voie pour la production à large échelle des plants de *R. heudelotii*. Elle peut se faire par microbouturage [5], bourgeonnement adventif ou embryogenèse somatique [6]. Ce dernier processus est plus avantageux, car il permet d'obtenir des vitroplants ayant un système racinaire pivotant qui leur permettra de résister aux intempéries climatiques après leur transfert en champ.

Chez la plupart des espèces végétales, l'équilibre phytohormonal des milieux de culture est l'un des facteurs principaux influençant la réussite de l'embryogenèse somatique [7, 8]. En effet, les phytohormones interagissent sur les processus physiologiques en intervenant directement sur le métabolisme cellulaire et en modifiant les substances de croissance endogènes [9–11]. L'activité des peroxydases dégrade certaines auxines et certains phénols, à faible dose, réagissent avec l'eau oxygénée formée au cours de l'oxydation d'auxines, telles que l'acide naphthalène acétique (ANA), l'acide indole-3 acétique (AIA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), et protègent les constituants cellulaires de leur effet toxique [12, 13]. Les cytokinines, quant à elles, activent la synthèse de l'ARN et stimulent la synthèse des protéines, ce qui se traduit par des modifications dans l'activité, la distribution et la nature de divers isoenzymes, tels que les peroxydases, et divers enzymes de métabolisme des sucres [14, 15].

Quelques travaux ont été réalisés sur l'embryogenèse somatique de *R. heudelotii*. Les explants utilisés ont été cultivés sur des milieux enrichis par différentes combinaisons d'auxines et de cytokinines [6, 16, 17]. Or, la teneur en sucres, phénols et protéines, et l'activité des peroxydases sont des paramètres physiologiques impliqués dans l'embryogenèse somatique de certains végétaux tels que *Picea abies* [18], *Dactylis glomerata* [19], *Hevea brasiliensis* [20] et *Theobroma cacao* [21]. Ces paramètres stimulent ou inhibent le processus. L'analyse et le dosage de ces paramètres physiologiques au cours de l'embryogenèse somatique chez *Theobroma cacao* par Omokolo *et al.* [22] et chez *Citrus grandis* par Huang *et al.* [23] ont montré que ces teneurs sont fortement influencées par la nature et la concentration des phytohormones contenues dans les milieux de culture. De tels dosages n'ayant pas encore été effectués chez *R. heudelotii*, nous avons donc cherché à déterminer l'effet du 2,4-D et des combinaisons [2,4-D / BAP] ou [2,4-D / kinétine] exogènes sur les teneurs en sucres, phénols et protéines, ainsi que sur l'activité des peroxydases, au cours de l'embryogenèse somatique de cette espèce, cela au fur et à mesure du développement des cals. La maîtrise de ces paramètres pourrait être, en effet, un indicateur exploitable pour la production rapide et en nombre d'embryons somatiques, suivie de leur conversion en vitroplants viables, en vue de la propagation et de la domestication de *R. heudelotii*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal et préparation des explants

Les explants utilisés pour la micropropagation de *R. heudelotii* ont été obtenus à partir de jeunes feuilles au stade étalées, prélevées sur un arbre portant des fruits dans la région de Santchou, à l'ouest du Cameroun. Ces feuilles ont été lavées à l'eau courante pendant 1 h, désinfectées par trempage dans une solution de Tween[®] 80 à 0,1 % pendant 5 min, puis dans une solution d'hypochlorite

de sodium à 3 % pendant 25 min, avant d'être rincées par trois bains de 5 min dans de l'eau distillée stérile, cela sous flux laminaire horizontal (hotte Mecaplex) près de la flamme d'un bec Bunsen. Les feuilles aseptisées ont été sectionnées en fragments de 1 cm².

2.2. Milieu de culture *in vitro*

Les explants de feuilles stériles ont été mis en culture sur un milieu de Driver et Kuniyuki [24], enrichi de 30 g saccharose·L⁻¹, 6 g agar (Difco)·L⁻¹, 2 g glutamine·L⁻¹ et d'un complexe vitaminique de Morel et Wetmore [25]. Ces éléments ont constitué le milieu de base utilisé lors de nos expérimentations.

Pour induire les cals et la formation d'embryons somatiques, nous avons testé l'effet de diverses phytohormones introduites dans le milieu de base :

– l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) utilisé à (1, 2 ou 3) mg·L⁻¹,

– des combinaisons de [2,4-D / kinétine] et de [2,4-D / benzylaminopurine (BAP)] dosées à 1 mg de 2,4-D·L⁻¹ pour (1, 2 ou 3) mg de kinétine ou de BAP par litre.

Le pH de tous les milieux a été ajusté à 5,6. Les milieux ont été stérilisés par autoclavage à 115 °C pendant 30 min, sous une pression de 1,6 kg·cm⁻².

Un premier et un deuxième repiquage des cals ont été réalisés, sur ces mêmes milieux d'induction, respectivement 30 j et 50 j après la mise en culture des fragments de feuilles.

Toutes les cultures ont été placées dans une salle à (27 ± 1) °C, avec une photopériode de 16 h de lumière et une intensité lumineuse de 80 μmol·m⁻²·s⁻¹.

Différentes analyses ont été réalisées sur des cals prélevés dans les différents milieux à (30, 50 et 70) j de culture.

2.3. Analyses histologiques

Les cals prélevés ont été fixés pendant 72 h par de l'AFA (alcool formolé acétique à 90 mL d'éthanol 70°, 5 mL de formaldéhyde

et 5 mL d'acide acétique). Ils ont été ensuite lavés sous l'eau courante pendant 24 h avant d'être déshydratés par trois bains successifs, de 30 min chacun, dans l'éthanol 80°.

Après trois immersions, de 30 min chacune, dans des mélanges [éthanol – toluène] dans les proportions respectives de [3/4 – 1/4], [1/2 – 1/2], [1/4 – 3/4], les cals ont été inclus dans de la paraffine. Des coupes de 10 μm ont été réalisées au microtome rotatif. Après déparaffinage par trempage successif dans le toluène (1 h), éthanol 95° (1 h) et éthanol 70° (10 min), les coupes ont été rincées trois fois à l'eau distillée pendant 30 min et colorées à l'hématoxyline de Regaud-Safranime O. Les observations ont été faites au microscope photonique (Nikon 233729, Japon) équipé d'un appareil photographique.

2.4. Extraction et analyse des sucres

Les sucres ont été extraits selon la méthode de Booij *et al.* [26]. Les cals (1 g) ont été broyés dans 5 mL d'éthanol 90°. Après chauffage au reflux pendant 20 min à 25 °C, l'homogénat a été centrifugé pendant 25 min à 5000 g. Le surnageant a constitué la fraction soluble des sucres totaux. Les sucres ont été dosés au spectrophotomètre à 670 nm selon la méthode à l'anthrone [27].

2.5. Extraction et analyse des phénols

Les phénols ont été extraits selon la méthode de Macheix *et al.* [28]. Les cals (1 g) ont été broyés dans 5 mL de méthanol 80°, à 4 °C. Le broyat a été centrifugé à 5000 g pendant 20 min. Le surnageant a constitué la fraction soluble des phénols totaux. Les phénols ont été dosés au réactif de Folin-Ciocalteu au spectrophotomètre à 725 nm selon la méthode de Marigo [29].

2.6. Extraction et analyse des protéines

Les protéines solubles totales ont été extraites selon la méthode de Lecouteux *et al.* [30]. Les cals (1 g) ont été broyés dans 5 mL de tampon phosphate 0,25 M, pH 7, et

centrifugés pendant 20 min à 6000 g. Le surnageant a constitué la fraction de protéines solubles. Les protéines ont été dosées au spectrophotomètre à 595 nm selon la méthode de Bradford [31].

2.7. Extraction et analyse des peroxydases

L'extraction des peroxydases a été faite au tris-maléate (50 mM, pH 7) additionné de mannitol à 0,15 M et de $MgCl_2$ à 1 mM. Les cals (1 g) ont été broyés dans ce mélange. Le broyat obtenu a été incubé 1 h dans de la glace pilée, puis centrifugé à 6000 g pendant 20 min. Le surnageant a constitué la fraction soluble des peroxydases. L'activité des peroxydases a été dosée selon la méthode de Thorpe *et al.* [32]. Elle a été exprimée en absorbance à 420 nm par 100 g de matière fraîche après 5 min de réaction.

2.8. Analyses statistiques

La formation des cals sur milieu d'induction et celle des embryons somatiques sur milieux de repiquage ont été testées à partir de la mise en culture de 50 explants par milieu de culture utilisé et chaque expérimentation a été répétée deux fois. Les résultats obtenus ont été traités par analyse de variances avec test de Duncan (logiciel SPSS, version 10.1 pour Windows).

3. Résultats

3.1. Phytohormones, callogenèse et formation des embryons somatiques

Les fragments de feuille cultivés sur milieu de base enrichi avec (1 à 3) $mg\ 2,4-D \cdot L^{-1}$ ou avec différentes combinaisons de [2,4-D / kinétine] ou [2,4-D / BAP] ont formé des cals après 30 j de cultures, avec des pourcentages variables selon les phytohormones utilisées et leurs concentrations.

L'utilisation de 2,4-D seul a permis d'obtenir le maximum d'explants callogènes (72,1 %) avec la concentration de $3\ mg \cdot L^{-1}$.

La combinaison [2,4-D / BAP] a été la plus efficace (100 %) aux concentrations de [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + 3\ mg\ BAP \cdot L^{-1}$], alors que l'association [2,4-D / kinétine] a permis d'obtenir le meilleur taux de cals (83,4 %) avec [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + 1\ mg\ kinétine \cdot L^{-1}$] (*tableau I*).

Les poids moyens des cals mesurés après (30, 50 et 70) j de culture ont augmenté au cours du temps. Ils ont cependant varié en fonction de la nature des phytohormones et de leur combinaison. Ainsi, en présence de 2,4-D seul, le poids moyen des cals s'est échelonné de 0,09 g ($2\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1}$) après 30 j de culture à 0,43 g ($3\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1}$) après 70 j. En présence de [2,4-D / BAP], il a varié de 0,11 g [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + 2\ mg\ BAP \cdot L^{-1}$] après 30 j à 0,40 g [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + 3\ mg\ BAP \cdot L^{-1}$] après 70 j. Dans le même intervalle de temps, en présence de [2,4-D / kinétine], la variation a été de 0,13 g [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + 2\ mg\ kinétine \cdot L^{-1}$] à 0,42 g [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + (2\ ou\ 3)\ mg\ kinétine \cdot L^{-1}$] (*tableau I*).

Après 50 j de culture, les cals développés étaient jaunâtres et noduleux (*figure 1a*). Au bout de 70 j de culture, des embryons somatiques ont pu être observés sur les cals formés en présence soit de 2,4-D seul ($3\ mg \cdot L^{-1}$), soit de [2,4-D / kinétine] à la concentration de [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + 1\ mg\ kinétine \cdot L^{-1}$], soit de [2,4-D / BAP] à la concentration de [$1\ mg\ 2,4-D \cdot L^{-1} + 2\ mg\ BAP \cdot L^{-1}$]. Pour ces concentrations et combinaisons de phytohormones, les pourcentages des cals embryogènes ont respectivement été de 17,4 %, 23,1 % et 27,6 %. Dans les trois cas, chaque cal portait un nombre moyen maximal de (12 ± 2) embryons somatiques de formes variées (*figure 1b*).

3.2. Structure des embryons et analyse histologique des cals embryogènes

Après repiquage dans des milieux identiques à ceux utilisés pour l'induction, les cals ont acquis des compétences embryogènes par individualisation de cellules embryogènes dans leur zone méristématique périphérique. Ces cellules se sont alors entourées d'une paroi plus ou moins épaisse. Après 50 j sur ces mêmes milieux, les cellules

Tableau I.

Effet de trois phytohormones exogènes sur la callogenèse et la croissance de cals issus de fragments de feuille de *Ricinodendron heudelotii*, en fonction du stade de développement des cals (Cameroun). Milieu de culture de base de Driver et Kuniyuku.

Phytohormones testées (mg·L ⁻¹)			Pourcentage des explants callogènes (%)	Poids des cals (g)		
2,4-D	BAP	Kinétine		30 j	50 j	70 j
1	–	–	31,0	0,11 a	0,22 b	0,31 a
2	–	–	62,0	0,09 a	0,18 a	0,35 b
3	–	–	72,1	0,19 b	0,28 c	0,43 c
1	1	–	35,0	0,18 b	0,20 a	0,33 b
1	2	–	57,0	0,11 a	0,19 a	0,28 a
1	3	–	100	0,20 b	0,33 b	0,40 c
1	–	1	83,4	0,22 b	0,25 a	0,29 a
1	–	2	35,0	0,13 a	0,35 b	0,42 b
1	–	3	79,0	0,20 b	0,29 a	0,42 b

Les valeurs ayant la même lettre dans la même colonne et pour chaque combinaison en phytohormones ne sont pas significativement différentes à $P = 0,05$, test de Duncan.

embryogènes ont commencé à se diviser pour former des proembryons (*figure 2c*). Les proembryons se sont ensuite entourés d'un épiderme, puis ont grossi pour devenir des embryons aux formes variées : globulaire, cordiforme ou torpille (*figure 1b*). L'observation microscopique de ces différentes formes a permis d'identifier, sur chacune d'elles, un pôle apical et un pôle radulaire (*figures 2a, 2b*). Les coupes réalisées au niveau des embryons somatiques globulaires ou cordiformes ont révélé une zone procambiale (*figure 2d*). En revanche, celles réalisées sur les embryons somatiques en forme de torpille ont montré une zone cambiale et un amas épidermique bien différenciés (*figure 2e*).

3.3. Phytohormones et teneur en sucres totaux

Sur milieu de base contenant la seule phytohormone 2,4-D, les teneurs maximales des cals en sucres totaux ont été obtenues en présence de 2 mg 2,4 D·L⁻¹, quel que soit le stade de développement des cals considéré

[(30, 50 ou 70) j]. Cependant, la teneur en sucres la plus élevée [(6,48 ± 0,12) µg·mg⁻¹ de poids frais] a été obtenue après 70 j de culture (*tableau II*).

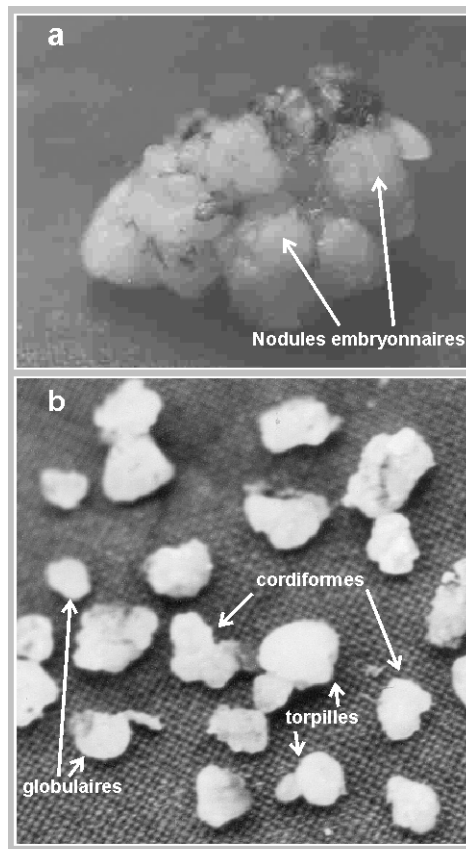
En présence de la combinaison [1 mg 2,4-D + 1 mg kinétine], les teneurs maximales en sucres totaux ont été obtenues à 30 j [(7,12 ± 0,26) µg·mg⁻¹ de PF] et 50 j [(8,07 ± 0,12) µg·mg⁻¹ PF]. À 70 j, les teneurs en sucres ont été significativement inférieures à ces maxima, quelle que soit la combinaison [2,4-D / kinétine] considérée (*tableau II*).

Avec la combinaison [1 mg 2,4-D + 1 mg BAP], la teneur maximale en sucres totaux des cals a été de (8,70 ± 0,08) µg·mg⁻¹ PF, mesurée après 50 j de culture (*tableau II*).

D'une manière générale, les teneurs en sucres totaux les plus élevées ont été obtenues avec les combinaisons de deux phytohormones après 50 j de culture. Toutes les teneurs obtenues avec le 2,4-D utilisé seul ont été inférieures à ces valeurs (*tableau II*). Toutefois, quel qu'ait été le type de phytohormone utilisé, les teneurs en sucre ont été relativement faibles après 70 j de développement des cals par rapport à celles

Figure 1.

(a) Cal de *Ricinodendron heudelotii* âgé de 30 j portant des nodules embryonnaires, sur milieu de base additionné de [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 3 mg BAP·L⁻¹]. (b) Embryons somatiques multifformes isolés des cals après 70 j de culture sur milieu de base additionné de [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 2 mg BAP·L⁻¹].



mesurées à (30 et 50) j. Le stade de 70 j coïncide avec la vitrification partielle des cals et la différenciation des embryons somatiques sur ces derniers.

3.4. Phytohormones et teneurs en phénols

Sur milieu de base contenant la seule phytohormone 2,4-D, les teneurs maximales des cals en phénols ont été obtenues en présence de 3 mg 2,4 D·L⁻¹, quel que soit le stade de développement des cals considéré [(30, 50 ou 70) j]. Cependant, quelle que soit la concentration de 2,4-D testée [(1, 2 ou 3) mg·L⁻¹], les teneurs en phénols des cals ont été plus élevées à 70 j qu'à (30 ou 50) j (*tableau II*).

En présence des trois concentrations de [2,4-D / kinétine], il y a eu très peu de variation des teneurs en phénols dans les cals après 30 j de culture par rapport aux diffé-

rences observées à (50 ou 70) j. Dans l'ensemble, les teneurs les plus élevées ont été mesurées à 70 j et la teneur la plus élevée [(9,09 ± 0,22) µg·mg⁻¹ PF] a été obtenue avec [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg BAP·L⁻¹] (*tableau II*).

Avec les combinaisons impliquant [2,4-D / BAP], les teneurs en phénols, bien que présentant certaines variations, ont été faibles à (30 et 50) j par rapport aux résultats obtenus après 70 j de culture (*tableau II*).

D'une manière générale, pour toutes les combinaisons de phytohormones testées, les teneurs en phénols ont été plus élevées après 70 j de culture qu'après (30 ou 50) j. La teneur la plus élevée [(10,48 ± 0,39) µg·mg⁻¹ PF] a été observée avec le 2,4-D utilisé seul à 3 mg·L⁻¹ (*tableau II*).

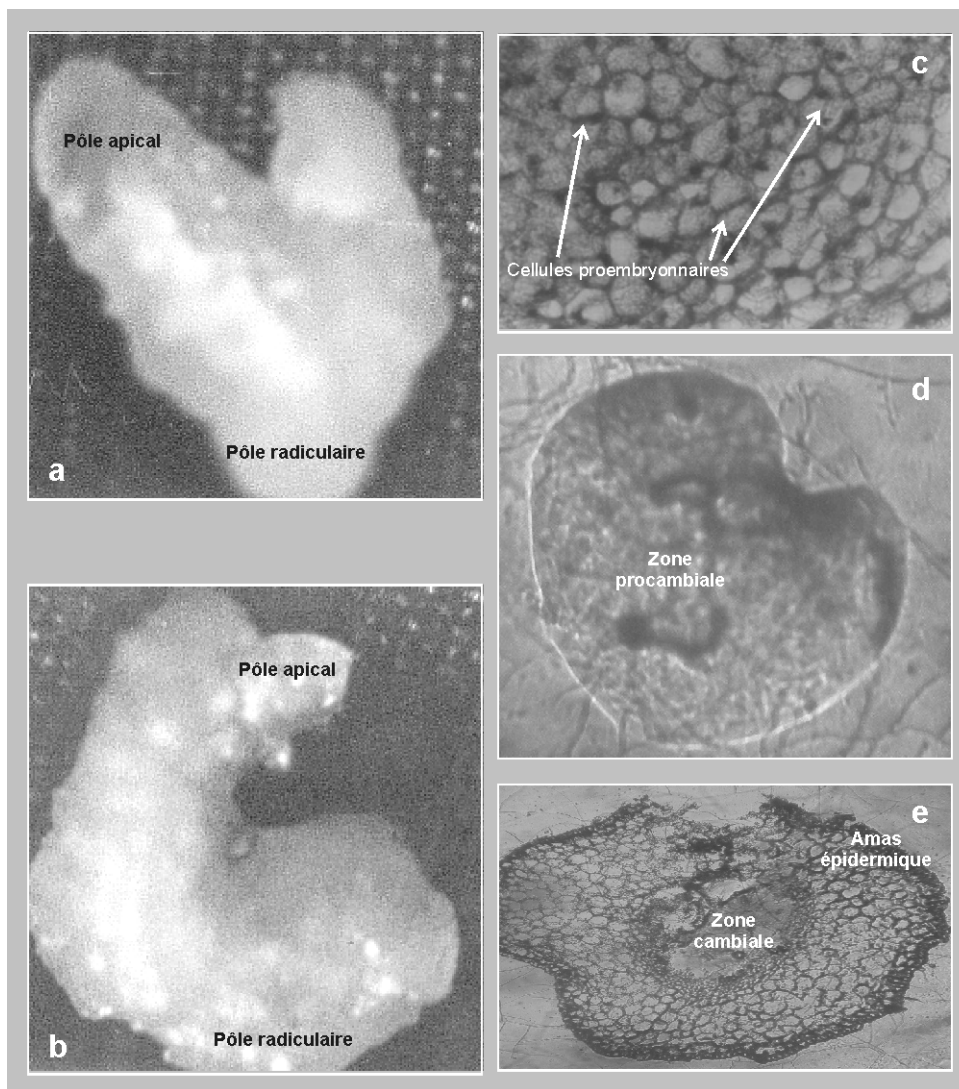
3.5. Phytohormones et activité des peroxydases

L'activité des peroxydases et les teneurs en protéines totales ont été analysées après (30, 50 et 70) j de culture sur milieux de culture de base enrichis en phytohormones aux trois concentrations suivantes : [1 mg 2,4-D·L⁻¹], [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg kinétine·L⁻¹] et [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg BAP·L⁻¹]. Les analyses faites sur les cals développés sur les milieux contenant les autres concentrations et formulations de phytohormones n'ont pas donné de résultats significativement différents.

En présence de [1 mg 2,4-D·L⁻¹], l'activité des peroxydases des cals a augmenté de [(12,15 ± 0,08) DO·100 mg⁻¹ de PF·5 min⁻¹], mesuré au début des cultures (0 j), à [(20 ± 0,31) DO·100 mg⁻¹ PF·5 min⁻¹] mesuré après 70 j (*figure 3*).

Avec la combinaison [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg kinétine·L⁻¹], l'activité des peroxydases a baissé entre le premier jour de l'expérimentation [(12,15 ± 0,08) DO·100 mg⁻¹ PF·5 min⁻¹] et le cinquantième jour [(9,28 ± 0,09) DO·100 mg⁻¹ PF·5 min⁻¹], puis elle a augmenté jusqu'à atteindre [(14,35 ± 0,06) DO·100 mg⁻¹ PF·5 min⁻¹] à 70 j de culture (*figure 3*).

En présence de la combinaison [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg BAP·L⁻¹], l'activité des peroxydases a augmenté progressivement du début des cultures [(12,15 ± 0,08) DO·100 mg⁻¹ PF·

**Figure 2.**

Embryogenèse somatique de *Ricinodendron heudelotii* : (a et b) embryons somatiques cordiforme (a) et globulaire (b), formés sur milieu de base additionné de [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 2 mg BAP·L⁻¹], présentant un pôle apical et un pôle radulaire. (c) Section transversale d'un cal embryogène âgé de 50 j présentant des cellules proembryonnaires. (d) Coupe longitudinale d'un embryon somatique cordiforme issu d'un cal âgé de 70 j présentant une zone procambiale. (e) Coupe longitudinale d'un embryon somatique « torpille » issu d'un cal âgé de 70 j présentant une zone cambiale et un amas épidermique.

5 min⁻¹] à la fin de l'expérimentation. À 70 j, elle a été de [(17,53 ± 0,41) DO·100 mg⁻¹ PF·5 min⁻¹] (figure 3).

Globalement, quelle que soit la catégorie de phytohormones testée, l'activité des peroxydases a été la plus élevée à 70 j de culture.

3.6. Phytohormones et teneurs en protéines totales

Au cours de notre expérimentation, la teneur en protéines totales des cals a varié de [(0,21 ± 0,02) µg·mg⁻¹ PF] en début de

cultures (0 j) à [(0,44 ± 0,02) µg·mg⁻¹ PF] après 70 j de culture en présence de 1 mg 2,4-D·L⁻¹ introduit dans le milieu de base (figure 4).

En présence de [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg kinétine·L⁻¹], cette teneur a évolué de [(0,21 ± 0,02) µg·mg⁻¹ PF], mesuré au début des cultures, à [(0,30 ± 0,01) µg·mg⁻¹ PF] obtenu à 30 j, puis elle est restée la même jusqu'à 70 j (figure 4).

Avec [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg BAP·L⁻¹], la teneur en protéines totales mesurée dans les cals a également augmenté entre le début des cultures et le stade de 30 j. Elle a subi

Tableau II.

Effet de trois phytohormones exogènes sur les teneurs en sucres et en phénols dans des cals issus de fragments de feuille de *Ricinodendron heudelotii*, en fonction du stade de développement des cals (Cameroun). Milieu de culture de base de Driver et Kuniyku.

Phytohormones testées (mg·L ⁻¹)			Teneur en sucres ¹ (µg·mg de poids frais)			Teneur en phénols ² (µg·mg de poids frais)		
2,4-D	BAP	Kinéline	30 j	50 j	70 j	30 j	50 j	70 j
1	–	–	3,88 ± 0,02 b	4,10 ± 0,10 a	4,02 ± 0,09 b	4,02 ± 0,07 a	4,26 ± 0,19 a	7,24 ± 0,31 b
2	–	–	4,16 ± 0,36 c	6,10 ± 0,08 b	6,48 ± 0,12 c	4,17 ± 0,26 a	6,08 ± 0,31 b	6,49 ± 0,19 a
3	–	–	3,01 ± 0,07 a	4,13 ± 0,41 a	3,87 ± 0,08 a	8,25 ± 0,53 b	9,26 ± 0,14 c	10,48 ± 0,39 c
1	1	–	5,83 ± 0,29 c	8,70 ± 0,08 c	3,15 ± 0,11 a	4,23 ± 0,08 c	3,06 ± 0,31 a	7,97 ± 0,15 a
1	2	–	5,12 ± 0,01 b	4,89 ± 0,06 a	4,09 ± 0,08 b	4,09 ± 0,07 b	3,26 ± 0,12 a	7,86 ± 0,26 a
1	3	–	4,12 ± 0,06 a	7,70 ± 0,13 b	6,70 ± 0,24 c	3,96 ± 0,04 a	3,86 ± 0,29 b	8,86 ± 0,33 b
1	–	1	7,12 ± 0,26 c	8,07 ± 0,12 c	3,59 ± 0,31 b	5,63 ± 0,08 a	2,83 ± 0,12 a	9,09 ± 0,22 c
1	–	2	5,98 ± 0,04 b	4,56 ± 0,23 a	2,87 ± 0,60 a	5,96 ± 0,35 b	5,50 ± 0,31 c	8,11 ± 0,13 b
1	–	3	5,33 ± 0,14 a	6,29 ± 0,07 b	4,08 ± 0,60 b	5,63 ± 0,19 a	4,08 ± 0,17 b	6,22 ± 0,16 a

Les valeurs ayant la même lettre dans la même colonne et pour chaque combinaison en phytohormone ne sont pas significativement différentes à $P = 0,05$, test de Duncan.

¹ Résultats à comparer à la teneur en sucres mesurée à 0 j de (3,52 ± 0,20) µg·mg PF.

² Résultats à comparer à la teneur en phénols mesurée à 0 j de (3,08 ± 0,66) µg·mg PF.

ensuite une légère baisse entre (30 et 50) j de culture avant de progresser pour atteindre [(0,32 ± 0,02) µg·mg⁻¹ PF] à 70 j (*figure 4*).

D'une manière générale, quelle que soit la catégorie de phytohormones testée, les teneurs en protéines totales mesurées dans les cals ont été les plus élevées à 70 j de culture.

4. Discussion

Les phytohormones exogènes – 2,4-D, kinéline et BAP – introduites séparément ou en combinaison dans des milieux de culture utilisés pour induire l'embryogenèse ont eu des effets variables sur la callogenèse et la formation des embryons somatiques de *R. heudelotii*.

L'étude de la callogenèse et de l'organogénèse *in vitro* chez *R. heudelotii* avait déjà été entreprise par Fotso *et al.* [16] et Omokolo [17] à partir de fragments de tige culti-

vés presque dans les mêmes conditions que celles adoptées dans ce travail. Ils avaient obtenu un taux maximal de 25,3 % d'explants formant des cals ; parmi eux, 11,04 % des cals différenciaient des bourgeons, et non des embryons somatiques, avec, en moyenne, 4,2 bourgeons par cal. Notre expérimentation aboutit à de meilleurs résultats par rapport à ces premières données. Ainsi, en présence de la combinaison [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 3 mg BAP·L⁻¹], le taux de callogenèse que nous avons obtenu a été de 100 %.

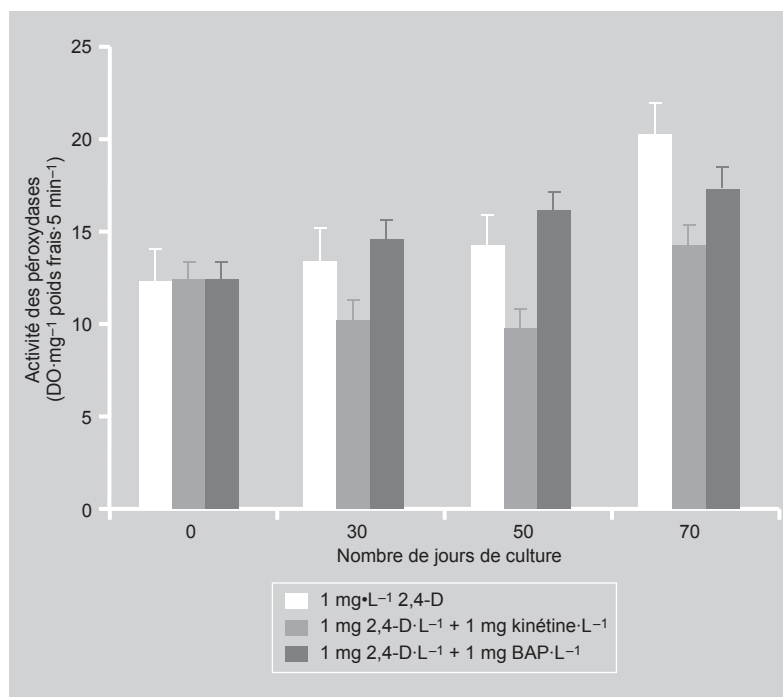
En étudiant l'embryogenèse somatique chez *R. heudelotii* à partir de cals issus de fragments de tige, sub-cultivés pendant 90 j sur un milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié, additionné de 100 mg glutamine·L⁻¹ et de différentes combinaisons de [BAP / 2,4-D], Fotso [6] avait obtenu 13,8 % de cals embryogènes avec, en moyenne, (5,4 ± 0,7) embryons par cal. Les résultats de notre présent travail ont montré que le 2,4-D, utilisé seul à la concentration de 3 mg 2,4-D·L⁻¹ ou associé à de la kinéline

ou à de la BAP dans la proportion [1 / 1], permettait d'obtenir un taux de cals embryogènes de l'ordre de (17,4 à 27,6) % avec, en moyenne, (12 ± 2) embryons somatiques par cal. Ces résultats témoignent donc également d'une amélioration par rapport aux résultats antérieurs obtenus chez la même espèce.

Cela étant, aucune étude histologique des cals embryogènes n'avait encore été menée chez *R. heudelotii*. Les analyses que nous avons effectuées sur les cals obtenus ont révélé la présence d'une zone méristématique, une individualisation des cellules embryogènes qui se divisent pour former des proembryons et, enfin, la formation d'embryons somatiques. Ceux-ci évoluent et forment un pôle apical et un pôle radulaire. Des observations similaires avaient été faites sur les cals de *Theobroma cacao* [33, 34], de *Quercus suber* [35], de *Coccoloba nucifera* [36] et de *Elaeis guineensis* [37].

L'analyse des paramètres biochimiques a mis en évidence des différences de teneurs en sucres totaux et en phénol, ainsi que des activités des peroxydases et des teneurs en protéines totales, en fonction des combinaisons de phytohormones et des stades de développement des cals.

Pour la teneur en sucres totaux des cals, les concentrations les plus élevées ont été obtenues à 50 j de culture des cals avec les combinaisons [2,4-D / kinétine] et [2,4-D / BAP] utilisées dans le rapport [1 / 1]. Globalement, pour les différentes combinaisons de phytohormones, les teneurs en sucre ont été relativement faibles après 70 j par rapport à celles mesurées à (30 et 50) j de développement des cals. Des observations analogues ont été rapportées à propos des cals embryogènes de *Tylophora indica* [38] et de *Mangifera indica* [39]. Mais, les teneurs en sucres totaux alors obtenues chez ces deux espèces apparaissent deux à trois fois supérieures à celles que nous avons nous-mêmes mesurées chez *R. heudelotii*. Ces résultats suggèreraient que, en présence de combinaisons [auxine / cytokinine], le métabolisme intervenant au cours des premiers stades de développement des cals embryogènes serait orienté vers la synthèse des sucres. Le phénomène



serait cependant atténué chez *R. heudelotii*. Ces sucres constituent la source de carbone pour le métabolisme cellulaire et permettent d'améliorer les potentialités embryogènes des cals. Ce rôle attribué aux sucres dans l'embryogenèse somatique *in vitro* a été déjà démontré par Cailou *et al.* [40] et Charbit [41] chez *Hevea brasiliensis* et par Gaspar [12] chez plusieurs espèces végétales.

Selon les différentes combinaisons de phytohormones utilisées, une hausse plus ou moins significative de la teneur en phénols, en protéines et de l'activité des peroxydases des cals a été notée après 70 j de culture, ce qui correspondrait à la différenciation des embryons somatiques. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Omokolo *et al.* [22] sur les cals de *Theobroma cacao* sub-cultivés pendant 90 j presque dans les mêmes conditions. De même, l'activité des peroxydases la plus élevée et la plus grande teneur en protéines ont été obtenues après 70 j de culture en présence de 1 mg 2,4-D·L⁻¹. Des résultats presque similaires ont été obtenus par Hrubcova *et al.* [42] après analyse des cals embryogènes de *Medicago sativa* régénérés sur milieu

Figure 3. Effet de trois phytohormones exogènes ajoutées à un milieu d'induction de base sur la variation de l'activité des peroxydases, au cours du développement de cals de *Ricini dendron heudelotii*, prélevés après (30, 50 et 70) j de culture *in vitro*.

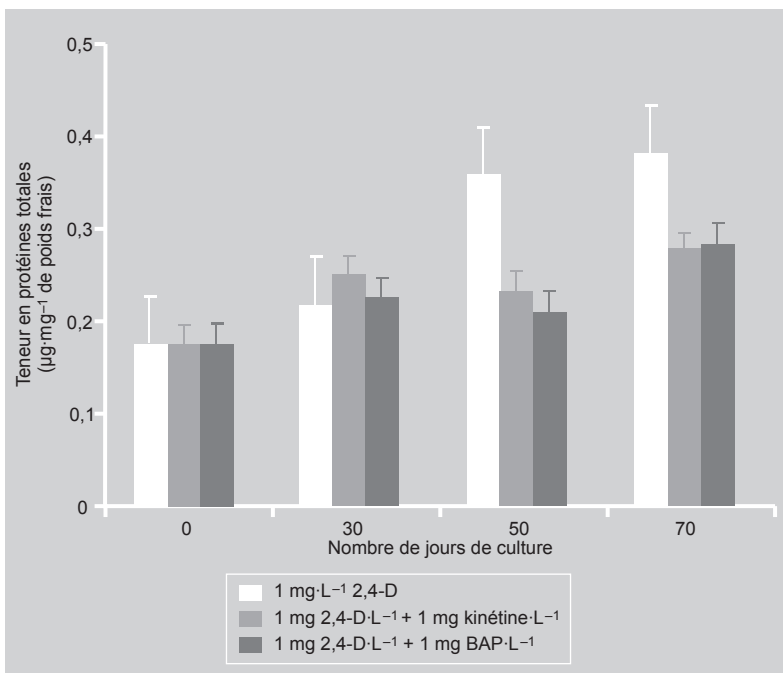


Figure 4. Effet de trois phytohormones exogènes ajoutées à un milieu d'induction de base sur la variation des teneurs en protéines totales, au cours du développement de cals de *Ricinodendron heudelotii*, prélevés après (30, 50 et 70) j de culture *in vitro*.

de Murashige et Skoog additionné de $5 \mu\text{M}$ 2,4-D·L⁻¹. Les paramètres biochimiques ainsi analysés seraient impliqués dans la formation des embryons somatiques chez *R. heudelotii*. Une telle implication a été déjà démontrée par Ansaldi [43] chez le café, par Charbit [41] chez *Hevea brasiliensis* et par Omokolo *et al.* [22] chez *Theobroma cacao*. En effet, Van Engelen et de Vries [44] et El Hadrami et d'Auzac [45] ont montré que les phénols qui agissent comme les antioxydants représenteraient le meilleur substrat des enzymes oxydatives qui contrôlent le niveau endogène des phytohormones impliquées dans la promotion de la différenciation des embryons somatiques. De plus, les enzymes oxydatives en général et les peroxydases en particulier pourraient limiter l'expansion des parois cellulaires pendant les premiers stades de la formation des embryons somatiques. Une telle limitation a déjà été démontrée chez *Picea abies* par Von Arnold *et al.* [46]. C'est donc par les propriétés antioxydatives et les fonctions de substrats des phénols, ainsi que par l'action limitatrice des peroxydases, que ces paramètres biochimiques interviendraient dans la formation des embryons somatiques au stade de 70 j du développement des cals chez *R. heudelotii*.

5. Conclusion

Chez *R. heudelotii*, il est possible d'obtenir jusqu'à 100 % de cals après 30 j de culture sur milieu d'induction additionné d'une combinaison de phytohormones, telle que [2,4-D / BAP]. L'analyse de la variation de paramètres biochimiques en fonction des différentes catégories de phytohormones utilisées et des stades de développement des cals au cours de l'embryogenèse somatique chez cette espèce a révélé une teneur élevée en sucres totaux dans les cals après (30 et 50) j de culture pour les combinaisons [2,4-D / kinétine] et [2,4-D / BAP]. Les sucres interviendraient surtout dans la formation des cals. Des teneurs élevées en phénols et en protéines totales, ainsi que des valeurs maximales de l'activité des peroxydases, ont été obtenues après 70 j de culture *in vitro* pour les différentes combinaisons de phytohormones testées. Ces paramètres, dont le métabolisme serait sous le contrôle des phytohormones utilisées, seraient surtout impliqués dans la différenciation des embryons somatiques sur les cals.

Références

- [1] Fondoun J.M., Tiki T.M., Kengue J., *Ricinodendron heudelotii* (Djansang): Ethnobotany and importance for forest dwellers in southern Cameroon, *Plant Genet. Res. Newsl.* 117 (1999) 1–11.
- [2] Ndoyé O., The market of non timber forest product in the humid forest zone of Cameroon and its borders: structure, conduct, performance and policy implication, CIFOR, Rep., Bogor, Indonesia, 1995, 86 p.
- [3] Shiemo P.N., Newton A.C., Leakey R.R.B., Vegetative propagation of *Ricinodendron heudelotii*, a West African fruit tree, *J. Trop. For. Sci.* 9 (1997) 514–525.
- [4] Nguelé O.S., Essai de greffage de *Ricinodendron heudelotii* (Baill.), Univ. Yaoundé I, mém. DESS, Yaoundé, Cameroun, 2000, 43 p.
- [5] Fotso, Donfagsiteli T.N., Mbouna D., Omokolo N.D., Propagation de *Ricinodendron heudelotii* par bouturage *in vitro*, *Fruits* 59 (5) (2004) 351–358.

- [6] Fotso, Organogenèse *in vitro* de quelques espèces forestières à usages multiples, Univ. Yaoundé I, Thèse, Yaoundé, Cameroun, 2005, 160 p.
- [7] Étienne H., Incidence des paramètres hydriques et hormonaux sur l'induction de l'ontogenèse des embryons somatiques d'*Hevea brasiliensis* en référence au modèle zygotique, Univ. Pierre et Marie Curie, thèse, Paris, France, 1993, 161 p.
- [8] Finstal K., Brown D.C.W., Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in Alfalfa tissue cultures, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 34 (1993) 125–152.
- [9] Auge R., Les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures *in vitro*, in: Beauchesne G., La culture *in vitro* et ses applications horticoles, 3^e éd., Presses Polytech. Romand., Lausanne, Suisse, 1989, pp. 7–15.
- [10] Faure O., Aarouf J., Metabolism of reserve products during development of somatic embryos in grapevine, *Plant Sci.* 96 (1994) 167–178.
- [11] Blanc G., Lardet L., Matin A., Jacob J., Carron M., Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis*, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1453–1462.
- [12] Gaspar T., Aspects physiologiques de l'organogenèse *in vitro*, in: Zryrd J.P. (Éd.), Culture de cellules, tissus et organes végétaux : Fondements théoriques et utilisations pratiques, Presses Polytech. Romand., Lausanne, Suisse, 1988, pp. 69–86.
- [13] Van Huystee R.B., Cairns W.L., Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development, *Phytochem.* 21 (1988) 1843–1847.
- [14] Georges E.F., Scherrington P.D., Plant propagation by tissue culture, Exegetic Ltd., Basingstoke, UK, 1984, 108 p.
- [15] Williams E.G., Maheswaran G., Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group, *Ann. Bot.* 57 (1986) 443–462.
- [16] Fotso, Donfagsiteli T.N., Mbouna D., Omokolo N.D., Régénération *in vitro* du *Riciodendron heudelotii*, *Cah. Agric.* 16 (1) 2007 31–36.
- [17] Omokolo N.D., Preliminary results on the *in vitro* regeneration of *Riciodendron heudelotii* (Baill.), in: Bosch C., Borus D., Siemonsma J. (Eds.), Proc. First Protia Int. Workshop, Protia Small Project Initiative (PSP), Nairobi, Kenya, 2002, pp. 325–326.
- [18] Wann S.R., Johnson M.A., Noland T.L., Carlson J.A., Chemical differences between embryogenic and non embryogenic callus of *Picea abies*, *Plant Cell. Rep.* 6 (1987) 39–42.
- [19] Somleva M.N., Schmidts E.D.L., De Vries S.C., Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* (Poaceae) explants identified by cell tracking and SERK expression, *Plant Cell. Rep.* 19 (2000) 718–726.
- [20] Lardet L., Piomo G., Oriol F., Dechamp E., Carron M.P., Relations between biochemical characteristics and conservation ability in *Hevea brasiliensis* zygotic and somatic embryo, *Can. J. Bot.* 27 (1999) 1168–1177.
- [21] Alemano I., Berthouly M., Michaux-Ferrière N., A comparison between *Theobroma cacao* zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33 (1997) 163–172.
- [22] Omokolo N.D., Ndzomo G.T., Niemenak N., Phenols content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L., *Biol. Plant.* 39 (3) (1997) 337–347.
- [23] Huang T., Peng S., Dong G., Zhang L., Li G., Plant regeneration from leaf derived callus in *Citrus grandis*: effects of auxins in callus induction medium, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 51 (2002) 35–41.
- [24] Driver J.A., Kuniyuki A.H., *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock, *Hort-Science* 19 (1984) 507–509.
- [25] Morel G., Wetmore R.H., Tissue culture of monocotyledons, *Am. J. Bot.* 38 (1951) 138–140.
- [26] Booij I., Piombo G., Risterucci J.M., Coupé M., Thomas D., Ferry M., Étude de la composition chimique de dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), *Fruits* 47 (1992) 667–677.
- [27] Ashwell G., Colorimetric analysis of saccharides, in: Colowick S., Kaplan N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Acad. Press Inc., New York, USA, 3, 1957, pp. 73–105.
- [28] Macheix J.J., Fleuriot A., Billot J., Fruit phenolic, CRC press Inc., Boca Raton, Fla., USA, 990, pp. 378–380.

- [29] Marigo G., Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux, *Anal.* 2 (1973) 106–110.
- [30] Lecouteux C.G., Lai F.M., Bryan D., Mc Kresie B.D., Maturation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos by abscisic acid, sucrose and chilling stress, *Plant. Sci.* 94 (1993) 207–213.
- [31] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–Dye binding, *Ann. Biochem.* 2 (1976) 248–254.
- [32] Thorpe T.A., Tran Thanh van M., Gaspar T., Isoperoxidases in epidermal layer of tobacco and changes during organ formation *in vitro*, *Physiol. Plant.* 44 (1978) 388–394.
- [33] Niemenak N., Recherche des marqueurs biochimiques et modifications histologiques au cours de la callogenèse et de l'embryogenèse somatique *in vitro* chez *Theobroma cacao* L., Univ. Yaoundé I, Thèse, Yaoundé, Cameroun, 1998, 138 p.
- [34] Alemanno L., Berthouly M., Michaux-Ferrière N., Histology of somatic embryogenesis from floral tissues of cacao, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 46 (3) (1996) 187–194.
- [35] El Maâtaoui M., Espagna H., Michaux-Ferrière N., Histology of callogenesis and embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*, *Ann. Bot.* 66 (1990) 183–190.
- [36] Verdeil J.L., Hocher V., Huet C., Grosdemange F., Escoute J., Ferrière N., Nicole M., Ultra structural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence, *Cah. Agric.* 88 (2001) 9–18.
- [37] Schwendiman J., Pannetier C., Michaux-Ferrière N., Histology of embryogenic formations during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq., *Oléagineux* 45 (1990) 409–418.
- [38] Jasanthi M., Mandala P.K., Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in *Tylophora indica*, *In vitro Cell Dev. Biol.* 37 (2001) 576–580.
- [39] De Wald S.G., Lithz R.E., Moore G.A., Optimizing somatic embryo production in mango, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 114 (1993) 712–716.
- [40] Cailou F., Julien-Guerrier J., Linossier L., Coudret A., Long term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*, *Plant Sci.* 120 (1996) 185–196.
- [41] Charbit E., Recherche des paramètres biochimiques et histologiques associés aux potentialités embryogènes et régénérant des cals friables entretenus d'*Hevea brasiliensis*, Univ. Montpellier II, Sci. Tech. Languedoc, Mém. DEA, Montpellier, France, 1998, 81 p.
- [42] Hrubcova M., Cvikrova M., Eder J., Peroxidase activities and contents of phenolic acids in embryogenic and non embryogenic *Medicago sativa* cell suspension cultures, *Biol. Plant.* 36 (1994) 175–182.
- [43] Ansaldi C., Recherche de descripteurs des phases précoces de l'embryogenèse somatique chez le café, Univ. Toulouse Paul Sabatier, Mém. DESS, Toulouse, France, 2002, 26 p.
- [44] Van Engelen F.A., de Vries S.C., Extra cellular proteins in plant embryogenesis, *Trends Genet.* 8 (1992) 66–70.
- [45] El Hadrami I., d'Auzac J., Effect of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus, *Ann. Bot.* 69 (1992) 323–325.
- [46] Von Arnold S., Clapham D., Egertstotter U., Mo L.H., Somatic embryogenesis in conifers, a case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*, *Plant Growth Regul.* 20 (1996) 3–9.

Efecto de fitohormonas exógenas sobre la evolución de ciertos parámetros bioquímicos durante la embriogénesis de células somáticas de *Riciodendron heudelotii* Baill.

Résumé — Introducción. Con el fin de introducir *Riciodendron heudelotii* (Euphorbiaceae) en los agrosistemas, pueden producirse plántulas con un sistema de raíz giratorio mediante embriogénesis somática *in vitro*. Estudiamos el efecto de algunas fitohormonas exógenas sobre ciertos parámetros bioquímicos característicos de la embriogénesis somática de la especie. **Material y métodos.** Se indujeron callos y embriones somáticos mediante cultivo de fragmentos de hojas en un medio de base enriquecido en (1, 2 ó 3) mg 2,4-D·L⁻¹ o de combinaciones [2,4-D / kinétilin] o [2,4-D / BAP] implicando diferentes concentraciones de las hormonas. Se llevaron a cabo las extracciones y los análisis de los azúcares totales, fenoles, proteínas totales, así como de la actividad de las peroxidasas; y esto, tras (30, 50 y 70) d de desarrollo de los callos. **Resultados.** Tras 30 d de cultivo, los mejores porcentajes de explantes que formarían callos variaron del 72,1 % hasta el 100 % de acuerdo con las fitohormonas empleadas. Tras 50 d de cultivo, estos callos formaron cúmulos globulares de células en división (nódulos embrionarios). Tras 70 d de cultivo, el 17,4 % de los callos se diferenciaron de los embriones somáticos multiformes en presencia de 3 mg 2,4-D·L⁻¹; 23,1 %, en presencia de [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 1 mg kinétilin·L⁻¹] y el 27,6 %, [1 mg 2,4-D·L⁻¹ + 2 mg BAP·L⁻¹]. El contenido de azúcares fue más elevado a 30 d (formación de los callos) y 50 d (formación de los nódulos embrionarios en los callos), mientras que los contenidos en fenoles, en proteínas y la actividad de las peroxidasas fueron más altas a 70 d (diferencia de los embriones somáticos en los callos). **Discusión y conclusión.** A imitación de lo que ocurre en otras especies vegetales, con *R. heudelotii*, las fitohormonas exógenas intervendrían, por lo tanto, en el control del metabolismo de los parámetros bioquímicos implicados en la formación de los embriones somáticos y de su desarrollo.

Camerún / *Riciodendron heudelotii* / micropropagación / callogénesis / embrión somático / sustancias de crecimiento vegetal / contenido de carbohidratos / contenido fenólico / contenido proteico / peroxidasas

