

N° d'ordre :

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université de Lille I
Discipline : Physiologie Végétale
par

Rachel GALLAND

**MISE EN EVIDENCE D'UN GENE DE GLUTATHION S-TRANFERASE
EXPRIME AU COURS DES STADES PRECOCES DE L'EMBRYOGENESE
SOMATIQUE DE LA CHICOREE**

Soutenue le 10 décembre 2001, devant la commission :

M Jacques VASSEUR	Professeur, USTL	Président du Jury
M Francis MARTIN	Directeur de Recherche, INRA, Nancy	Rapporteur
M Michel PETITPREZ	Professeur, ENSAT, Toulouse	Rapporteur
M Mondher EL JAZIRI	Professeur, ULB, Bruxelles	Examineur
M Jean-Louis HILBERT	Maître de Conférences, USTL	Examineur

RESUME

Chez le *Cichorium* hybride “474” (*Cichorium intybus* var. *sativum* x *Cichorium endivia* var. *latifolia*), l’embryogenèse somatique est directe et d’origine unicellulaire. De plus, la première division embryogène peut être retardée par l’addition de glycérol dans le milieu lors de la phase d’induction et synchronisée lors du transfert des tissus dans un milieu d’expression dépourvu de glycérol. Ces trois caractéristiques, spécifiques du modèle chicorée, facilitent l’étude des mécanismes inducteurs précoces de l’embryogenèse somatique.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la technique de “differential display” (DD RT-PCR) afin de mettre en évidence des modifications dans l’expression des gènes au cours des stades précoces de l’embryogenèse somatique de la chicorée. Nous avons comparé les populations d’ARNm accumulés dans les fragments foliaires placés en conditions d’embryogenèse somatiques pendant 0, 1, 2, 3, 4 et 7 jours. Un ADNc partiel présentant de fortes homologues avec des GSTs de plantes inductibles par l’auxine a ainsi été isolé. Il s’accumule fortement dans les fragments foliaires du génotype embryogène “474”, mais pas chez le génotype non embryogène Pévèle. La séquence complète de cet ADNc, nommé *CHI-GST1*, a été reconstituée après amplification de la partie 5’ par RACE-PCR. Des expériences d’hybridation *in situ* et d’immunolocalisation nous ont permis de localiser les transcrits et le produit du gène *CHI-GST1* dans les tissus foliaires. Les résultats obtenus suggèrent l’existence de plusieurs isoformes de GSTs chez la chicorée dont une serait spécifique des cellules réactivées et des cellules embryonnaires.

Mots clés : *Cichorium*, Differential Display, Embryogenèse Somatique, Glutathion S-transférase.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p 11
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	p 15
1.Présentation de l'embryogenèse somatique	p 17
1.1.Définitions.....	p 17
1.2.Origines de l'embryon somatique.....	p.18
2.Expression différentielle de gènes au cours de l'embryogenèse somatique	p 19
2.1.Analyse des profils protéiques.....	p 20
2.1.1.Les protéines tissulaires.....	p 20
2.1.2.Les protéines excrétées dans le milieu de culture.....	p 21
2.2.Etude des populations d'ARNm.....	p 23
2.2.1.Mise en évidence de marqueurs tardifs.....	p 23
2.2.2.La recherche de marqueurs précoces.....	p 27
3.Le <i>Cichorium</i> hybride "474" : un modèle pour l'étude de l'embryogenèse somatique directe	p 30
3.1.Le genre <i>Cichorium</i>	p 30
3.2.Les origines de l'embryogenèse somatique.....	p 30
3.3.Les facteurs inducteurs.....	p 31
3.4.Les marqueurs de l'embryogenèse somatique.....	p 32
3.4.1.Les marqueurs cytologiques.....	p 32
3.4.2.Les marqueurs protéiques.....	p 35
3.4.3.Les gènes marqueurs.....	p 35
3.5.Présentation de l'étude.....	p 38
MATERIEL ET METHODES	p 39
1.Matériel végétal	p 41
1.1.Le <i>Cichorium</i> hybride "474".....	p 41
1.2.Milieus et conditions de culture.....	p 43
1.2.1.Milieu de base M17.....	p 43
1.2.2.Multiplification de plantules de <i>Cichorium</i> hybride "474" par embryogenèse somatique à partir de racines.....	p 43
1.2.3.Embryogenèse somatique à partir de feuilles de plantules de <i>Cichorium</i> hybride "474".....	p 43
1.2.4.Traitement à l'acide 2,4-dichlorophénoxy acétique (2,4-D).....	p 46
1.2.5.Culture en conditions statiques à 25°C et 35°C.....	p 46
2.Analyse moléculaire	p 46
2.1.Extraction et purification des ARNm polyadénylés.....	p 46

2.1.1.Extraction des ARN totaux.....	p 46
2.1.2.Purification des ARNm polyadénylés par chromatographie d'affinité	p 48
2.2.Transcription inverse différentielle des ARNm polyadénylés et amplification par PCR (Differential Display RT-PCR).....	p 49
2.2.1.La transcription inverse.....	p 50
2.2.2.L'amplification par PCR.....	p 51
2.2.3.Séparation et révélation des ADNc.....	p 53
2.2.4.Elution des fragments d'ADN du gel.....	p 54
2.3.Amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ADNc (5' RACE-PCR).....	p 55
2.4.Amplification de l'ADN génomique.....	p 57
2.5.Clonage des fragments PCR.....	p 57
2.6.Séquençage.....	p 59
2.7.Northern blot.....	p 59
2.7.1.Migration et transfert des ARN totaux.....	p 59
2.7.2.Marquage de la sonde chaude.....	p 60
2.7.3.Hybridation.....	p 60
3.Etude de la protéine.....	p 61
3.1.Production de la protéine recombinante CHI-GST1.....	p 61
3.1.1.Le vecteur d'expression.....	p 61
3.1.2.Production et purification de la protéine.....	p 62
3.2.Activité enzymatique de la protéine recombinante CHI-GST1.....	p 64
3.3.Production d'anti-corps polyclonaux dirigés contre la protéine recombinante CHI-GST1.....	p 64
3.4.Extraction des protéines tissulaires.....	p 65
3.5.Immunodétection de la protéine tissulaire par Western blot.....	p 66
3.5.1.Electrotransfert sur membrane.....	p 66
3.5.2.Révélation.....	p 66
4.Etude cytologique.....	p 67
4.1.Préparation des coupes de tissus foliaires.....	p 67
4.2.Hybridation <i>in situ</i>	p 67
4.2.1.Préparation des ribosondes.....	p 67
4.2.2.Transcription.....	p 68
4.2.3.Digestion alcaline.....	p 70
4.2.4.Hybridation.....	p 71
4.3.Immunolocalisation.....	p 73
RESULTATS.....	p 75
1.Mise en évidence et caractérisation d'un ADNc correspondant à un ARNm exprimé au cours de l'embryogenèse somatique de la chicorée.....	p 77
1.1.Isolement par DD RT-PCR d'un ADNc partiel correspondant à un ARNm exprimé différemment au cours des étapes précoces de l'embryogenèse somatique.....	p 77
1.2.Séquençage de l'ADNc partiel isolé.....	p 80
1.3.Obtention de l'ADNc pleine longueur.....	p 82
1.4.Etude de l'expression du gène <i>CHI-GST1</i>	p 87
1.4.1.Vérification des profils obtenus par DD RT-PCR.....	p 87
1.4.2.Influence de la température sur l'expression du gène <i>CHI-GST1</i>	p 89
1.4.3.Expression du gène <i>CHI-GST1</i> en réponse à un traitement au 2,4-D	p 90

1.4.4. Localisation des transcrits dans les tissus foliaires.....	p 90
2. Production et activité de la protéine recombinante.....	p 101
2.1. Le vecteur d'expression.....	p 101
2.2. Clonage de l'ORF dans le vecteur d'expression.....	p 102
2.3. Production et purification de la protéine recombinante.....	p 103
2.4. Dosage de l'activité.....	p 104
3. Accumulation de la protéine dans les tissus foliaires de l'hybride "474".....	p 105
3.1. Etude électrophorétique.....	p 105
3.2. Localisation de la protéine native dans les tissus foliaires.....	p 107
DISCUSSION.....	p 117
1. Isolement d'une glutathion S-transférase par DD RT-PCR dans les tissus foliaires du <i>Cichorium</i> hybride "474", cultivés en conditions d'embryogenèse somatique.....	p 119
2. Les GSTs chez les plantes.....	p 121
3. Embryogenèse somatique et GSTs.....	p 124
4. Les GSTs chez le <i>Cichorium</i> hybride "474".....	p 126
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	p 135
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p 141
ANNEXES.....	p 159
Annexe 1 : Liste des amorces aléatoires utilisées pour la DD RT-PCR.....	p 161
Annexe 2 : Composition du tampon TBE 10X concentré.....	p 161
Annexe 3 : Composition des gels de polyacrylamide.....	p 162
Annexe 4 : Composition du milieu LB.....	p 162
Annexe 5 : Composition du tampon TTE.....	p 163
Annexe 6 : Carte du vecteur d'expression pET-16b.....	p 163
Annexe 7 : Carte du vecteur pBluescript.....	p 164
Annexe 8 : Composition du tampon PBS 10X concentré.....	p 164
Annexe 9 : Molécules antioxydantes et réactions catalysées par les enzymes du système de défense antioxydant.....	p 165
Annexe 10 : Réduction de l'H ₂ O ₂ par le cycle ascorbate-glutathion.....	p 166
Annexe 11 : Schéma du cycle eau-eau dans le chloroplaste et potentiels redox des espèces moléculaires réduites de l'oxygène.....	p 166
Annexe 12 : Les différentes étapes de la biosynthèse des lignines.....	p 169
Annexe 13 : Publication.....	

INTRODUCTION

Les végétaux ont la particularité de disposer de deux modes principaux de reproduction :

-la reproduction sexuée d'une part, qui aboutit à la formation d'un zygote par fusion de deux gamètes, produisant ainsi un individu nouveau dont le génotype est une combinaison de celui des parents,

-et la reproduction asexuée ou multiplication végétative d'autre part, qui assure la stabilité génétique en générant des individus tous identiques. Elle existe dans la nature de manière spontanée : production de stolons, bulbes, rhizomes...ou peut être provoquée par l'homme pour la multiplication de plantes d'intérêt agronomique : par greffage, bouturage, marcottage et plus récemment, par micropopagation *in vitro*.

Parmi les différents modes de multiplication végétative, soulignons une caractéristique propre au règne végétal qui est la capacité d'initier et de développer des embryons à partir de cellules somatiques. Ce processus appelé embryogenèse somatique a été pour la première fois décrit sur des cals et des suspensions cellulaires de carotte (Stewards *et al.*, 1958 ; Reinert, 1958). L'embryogenèse somatique a rapidement trouvé des applications, telles que la propagation de génotypes sélectionnés, notamment chez les ligneux (Egertsdotter, 1996), la multiplication de lignées transgéniques (Wenck *et al.*, 1999 ; Levée *et al.*, 1999) ou encore la production de semences artificielles (Gray *et al.*, 1991). Bien que, la capacité à former des embryons somatiques ait été depuis mise en évidence chez 300 espèces agronomiques et horticoles (Griga, 1999), la technique n'est pas généralisable à tous les végétaux et varie en fonction de l'espèce, du génotype, du tissu ou des conditions de culture. C'est pourquoi, afin d'étendre cette technique de régénération et la généraliser, il est nécessaire d'étudier les mécanismes fondamentaux de l'embryogenèse. L'embryon somatique constitue un bon modèle pour l'étude des événements physiologiques, biochimiques et moléculaires ayant lieu lors du développement précoce des plantes supérieures. En effet, l'absence de tissus maternels entourant l'embryon somatique facilite son accès. De plus, le développement de l'embryon somatique bipolaire est caractérisé par les mêmes stades de développement globulaire, cordiforme et torpille observés lors de la formation de l'embryon zygotique, suggérant que

des mécanismes de régulation communs sont probablement impliqués dans les événements clés de l'embryogenèse (Zimmerman, 1993 ; figure 1).

Afin de préciser les mécanismes moléculaires précoces impliqués dans le contrôle de l'embryogenèse somatique chez les végétaux, nous avons appliqué la technique de mRNA "differential display" (Liang & Pardee, 1992) à un génotype embryogène de chicorée, le *Cichorium* hybride "474". Cette technique permettant une étude directe des modifications de l'expression génique, nous avons cherché à identifier des gènes marqueurs impliqués dans la réorientation d'une cellule somatique dédifférenciée vers une voie embryogène.

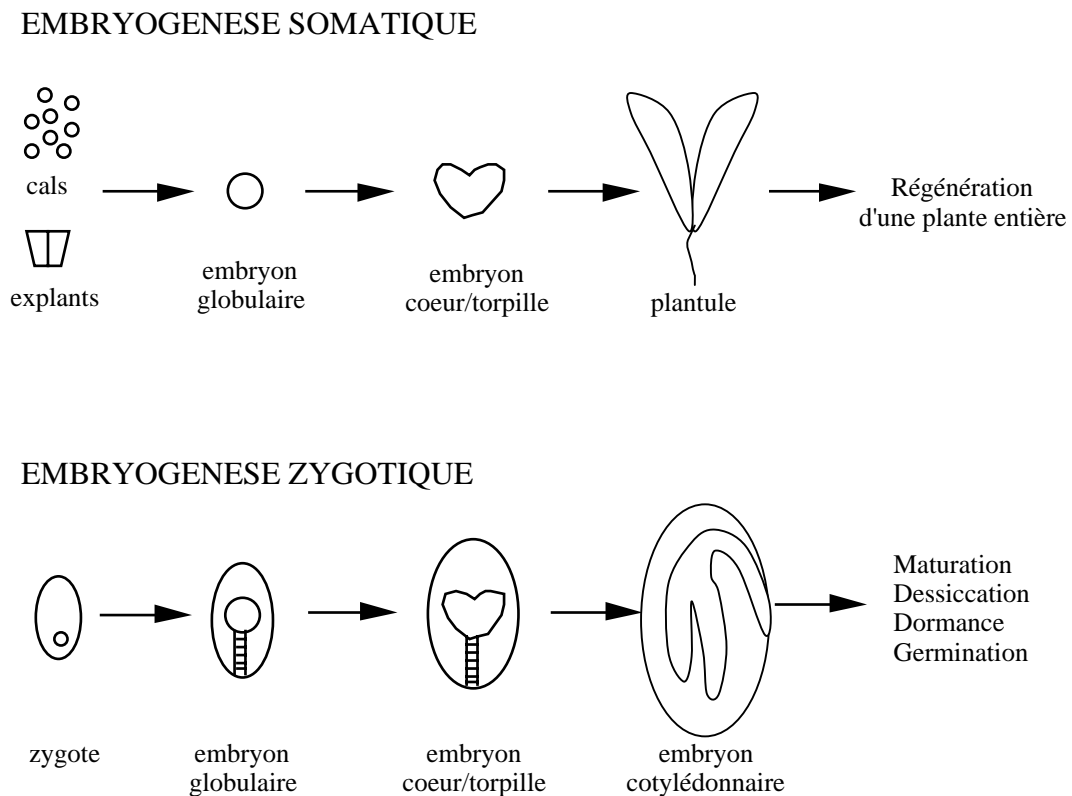


Figure 1 : Comparaison entre l'embryogenèse somatique et l'embryogenèse zygotique (D'après Zimmerman, 1993)

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail s'intègre dans une thématique globale d'étude du déterminisme de l'embryogenèse somatique chez le *Cichorium* hybride "474". L'approche développée ici consiste à rechercher des marqueurs moléculaires précoces de l'embryogenèse somatique. L'application de la technique de DD RT-PCR nous a permis de révéler des modifications dans l'expression des gènes au cours des étapes précoces de l'embryogenèse somatique et plus particulièrement pendant l'induction du processus. Un ADNc partiel présentant une accumulation différentielle lors des premiers jours de la culture embryogène de fragments foliaires a ainsi été isolé. Sa séquence est fortement homologue à celles de GSTs de plantes inductibles par l'auxine. La séquence complète de cet ADNc, nommé *CHI-GST1*, a été reconstituée après amplification de la partie 5' par RACE-PCR. L'expression du gène *CHI-GST1* a été analysée par northern blot. Lors de la culture embryogène, les transcrits sont détectés dans les tissus foliaires à partir du 3^{ème} jour d'induction, lors de l'observation des premières cellules réactivées, et s'accumulent jusqu'au 7^{ème} jour de culture. Cette accumulation n'est jamais mise en évidence dans les feuilles du génotype non embryogène *Pévèle*. De plus, les transcrits ne sont pas détectés dans les tissus foliaires du génotype embryogène cultivés à une température favorable au développement de cals et de bourgeons (25°C). Ces observations suggèrent que l'induction du gène *CHI-GST1* semble particulièrement liée au phénomène d'embryogenèse somatique. L'application d'une température de 35°C lors de la culture est nécessaire à l'induction de l'embryogenèse somatique, elle n'est cependant pas suffisante car, dans ces conditions, les tissus du génotype *Pévèle* ne développent pas d'embryons. Il semblerait que les 2 cultivars ne montrent pas la même sensibilité au stress. Ce phénomène a déjà été observé, Iturbe-Ormaetxe *et al.* (1998) notamment ont remarqué des différences dans la réponse du système antioxydant de 2 cultivars de pois exposés à un stress hydrique équivalent. Il nous semble intéressant de mesurer le taux de GSH dans les tissus foliaires de l'hybride "474" et de *Pévèle* afin de connaître l'état redox des cellules (déterminé par le rapport GSH/GSSH). Il a été montré que la concentration en GSH augmentait dans les tissus foliaires de conifères exposés à différents

stress (pollution à l'ozone, stress lumineux, stress hydrique, acclimatation au froid) (Tausz & Grill, 2000). En effet, la production d'H₂O₂ associée aux stress modifie les concentrations et l'état redox des antioxydants cellulaires tels que le GSH et l'ascorbate (Vanacker *et al.*, 1998). Or ces métabolites agissent comme des molécules signal. Chez la carotte, l'état redox est déterminant pour l'orientation des cellules vers la prolifération cellulaire ou le développement d'embryons somatiques (Earnshaw & Johnson, 1987). Un état fort réduit (taux important d'antioxydants) favorise la croissance inorganisée des cellules alors que l'achèvement du processus embryogène nécessite une diminution des concentrations en antioxydants (GSH et AA). Ces concentrations sont contrôlées directement par le 2,4-D ajouté au milieu de culture. Les auteurs ont observé que l'augmentation des taux de GSH et d'AA dans les tissus était associée à la présence de 2,4-D. Dans le système chicorée, l'obtention des embryons somatiques ne passe pas par une phase de prolifération cellulaire et l'addition de 2,4-D n'est pas nécessaire à l'induction du processus. Il serait néanmoins intéressant de mesurer le taux d'auxine intratissulaire afin d'établir, si elle existe, une corrélation entre le niveau redox des cellules, le taux d'auxine, l'expression de *CHI-GST1* et l'induction de l'embryogenèse. Il est important de rappeler ici que *CHI-GST1* est un gène inductible par l'auxine, ce qui nous permet de supposer que son expression est sensible aux variations cellulaires de la concentration en auxine.

L'étude cytologique a révélé plusieurs localisations de la GST dans les tissus foliaires cultivés en conditions d'embryogenèse somatique, suggérant l'existence d'isoformes. C'est pourquoi, nous envisageons dans un premier temps de vérifier l'existence de plusieurs gènes de GSTs chez la chicorée :

- par PCR, à l'aide d'amorces choisies dans des régions conservées
- par Southern blot, en utilisant la sonde *CHI-GST1* afin de mettre en évidence éventuellement plusieurs copies du gène *CHI-GST1*
- mais aussi par séquençage du fragment amplifié par RACE-PCR aux jours 0, 1 et 2.

Cette étude pourrait être complétée en testant les anti-corps anti *CHI-GST1* sur des protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle afin de mettre en évidence des isoformes de GSTs qui auraient une masse moléculaire identique.

Le seuil d'observation du microscope photonique utilisé pour l'observation des coupes ne nous permet pas toujours de localiser précisément le transcrite ou la protéine. Il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux par une étude en ultrastructure, à l'or colloïdal afin de préciser les types cellulaires et/ou les organites concernés. Les résultats ainsi obtenus nous

permettrons d'attribuer avec plus de précision un rôle aux GSTs mises en évidence par immunolocalisation.

Lors de cette étude, nous n'avons pas pu définir de façon précise la fonction de *CHI-GST1* durant la culture embryogène, nous pensons cependant qu'il est impliqué dans l'induction du processus embryogène. Un gène très homologue à des gènes de GSTs inductibles par l'auxine, le gène *EgHypar*, a été mis en évidence également dans un processus de différenciation. Il s'exprime lors de la mise en place de l'association symbiotique entre l'*Eucalyptus globulus* et le champignon *Pisolithus tinctorius* (Nehls *et al.*, 1998). Ces transcrits sont préférentiellement accumulés dans la racine des plantules et leur accumulation est accrue par l'addition d'AIA et de 2,4-D exogènes ou encore d'extrait de *P.tinctorius*, suggérant la présence de molécules inductrices chez le champignon ectomycorhizien. L'hypaphorine notamment, le composé indolique le plus abondant dans le mycélium et les exudats de *P. tinctorius*, semble induire le gène *EgHypar* et agirait comme une molécule signal lors des premières étapes de la relation de symbiose. Le gène *EgHypar* serait, d'après les auteurs, impliqué dans les changements morphologiques ayant lieu dans la racine lors de l'ontogenèse des tissus symbiotiques. Ces observations nous confortent dans l'idée du rôle de *CHI-GST1* lors de la mise en place du processus embryogène. C'est pourquoi, la mise au point de plantes transgéniques, réalisées à partir des deux génotypes embryogène et non embryogène, sur ou sous-exprimant le gène *CHI-GST1* serait une bonne approche pour l'étude de la fonction du produit de ce gène. Par ailleurs, l'étude du promoteur de *CHI-GST1* et de sa régulation aiderait à la compréhension de l'implication de *CHI-GST1* dans le processus d'embryogenèse somatique. Il a été montré que plusieurs promoteurs de GSTs de plantes renfermaient des éléments *ocs* (octopine synthase). Ces éléments composés d'une vingtaine de paires de bases ont été pour la première fois identifiés chez le virus de la mosaïque du chou-fleur (*as-1*, CaMV 25S) et chez *Agrobacterium tumefaciens* (*nos*, nopaline synthase). Chez les plantes, les promoteurs de gènes de GSTs sont les seuls à posséder ces éléments *ocs*. Ils semblent inductibles par le stress et répondent à une variété d'agents électrophiles tels que les hormones mais aussi l'H₂O₂ ou les métaux lourds générant des conditions de stress oxydatifs (Marrs, 1996). Chez le tabac, le facteur de transcription TGA 1a, de type glissière à leucine, induit l'expression de gènes de GSTs régulés par des éléments de type *as-1*, en réponse à des stress (Klinedinst *et al.*, 2000).

Les travaux développés ici illustrent la capacité des plantes à contrôler les changements environnementaux, par l'intermédiaire de capteurs, puis à coordonner les voies de

transduction qui convertissent ces informations en réponses appropriées. Nous avons esquissé une de ces voies, mise en place lors de l'induction de l'embryogenèse, dans laquelle l'expression de *CHI-GST1* est induite en réponse à la production d'AOS engendrée par le stress de la culture (figure 43). Les circuits sensoriels ainsi que les voies de communication du signal restent cependant à préciser.

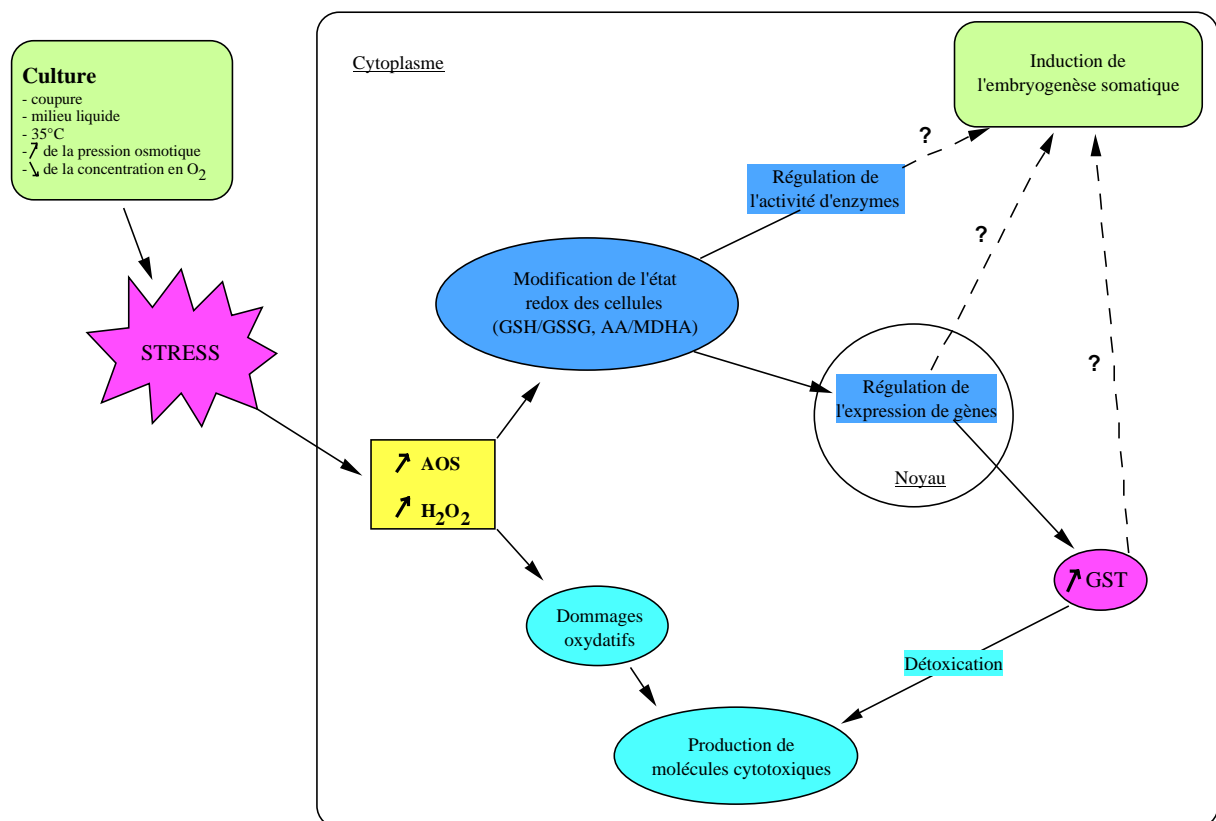


Figure 43 : Représentation schématique des événements consécutifs au stress occasionné aux cellules lors de la culture en conditions d'embryogenèse somatique. La production d'H₂O₂ engendrée par le stress modifie les concentrations et l'état redox des antioxydants intracellulaires. Ces variations influent sur la régulation de l'activité de certaines enzymes ou directement sur la régulation de l'expression de gènes codant des protéines du système de défense antioxydant, potentiellement impliquées dans l'induction de l'embryogenèse somatique, telle que la GST. Cette dernière serait d'autre part impliquée dans la détoxification des produits cytotoxiques générés par l'accumulation des AOS dans la cellule.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Assada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 601-639.
- Baskin, T.I., Busby, C.H., Fowke, L.C., Sammut, M., Gubler, F. (1992) Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. *Planta*, 187, 405-413.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 196, 80-83.
- Belletre, A., Couillerot, J.P., Vasseur, J. (1999) Effects of glycerol on somatic embryogenesis in *Cichorium* leaves. *Plant Cell Rep*, 19, 26-31.
- Bertioli, D.J., Burrows, P.R. (1995) A simple RACE method based on CTAB precipitation. *Meth Mol Cell Biol*, 5, 118-121.
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermin, L.S. (1997) Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J*, 328, 929-935.
- Bond, U., Schlesinger, M.J. (1987) Heat shock and development. *Adv Genet*, 24, 1-29.
- Borkird, C., Choi, J.H., Jin, Z.H., Franz, G., Hatzopoulos, P., Chorneau, R., Bonas, U., Pelegri, F., Sung, Z.R. (1988) Developmental regulation of embryonic genes in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 6399-6403.

- Boudet, A.M. (2000) Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiol Biochem*, 38, 1-16.
- Camefort, H. (1977) *Morphologie des végétaux vasculaires*. ed. Doin, Paris. ISBN 2-7040-0101-4.
- Chapman, A., Blervacq, A.S., Vasseur, J., Hilbert, J.L. (2000) Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta*, 211, 305-314.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Macdonald, R.J., Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry*, 19, 5294-5299.
- Choi, J.H., Sung, Z.R. (1989) Induction, commitment, and progression of plant embryogenesis. *Plant Biotech*, 11, 141-159.
- Christensen, J.H., Bauw, G., Welinder, K.G., van Montagu, M., Boerjan, W. (1998) Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol*, 118, 125-135.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., del Rio, L.A. (2001) Peroxisomes as source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sc*, 6, 145-150.
- Couillerot, J.P., Decout, E., Warnot, F., Dubois, J., Vasseur, J. (1993) Evolution des polyamines libres en relation avec la source carbonée et l'embryogenèse somatique chez un *Cichorium* hybride. *C R Acad Sci, Paris*, 316, 299-305.
- De Jong, A.J., Cordewener, J., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckove, J., Van Kammen, A., De Vries, S.C. (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, 4, 425-433.
- De Jong, A.J., Schmidt, E.D.L., De Vries, S.C. (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 22, 367-377.

- De Klerk, G.-J., Arnholdt-Schmidt, B., Lieberei, R., Neumann, K.-H. (1997) Regeneration of roots, shoots and embryos : physiological, biochemical and molecular aspects. *Biol Plant (Praha)*, 39, 53-66.
- De Vries, S.C., Booij, H., Meyernink, P., Huisman, G., Wilde, H.D., Thomas, T.L., Van Kammen, A. (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, 176, 196-204.
- Decout, E., Dubois, T., Guerida, M., Dubois, J., Audran, J.C., Vasseur, J. (1994) Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro* . *J Exp Bot*, 45, 1859-1865.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1, 19-21.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension culture. *Biochem J*, 15, 115-120.
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. (1998) Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. *Plant Mol Biol*, 36, 75-87.
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. (2001) Cloning and characterisation of plant theta and zeta class GSTs: Implications for plant GST classification. *Chem Biol Inter*, 133, 33-36.
- Dodeman, V.L., Ducreux, G. (1996) Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. *Plant Sci*, 120, 57-69.
- Domon, J.-M., Meyer, Y., Faye, L., David, A., David, H. (1994) Extracellular (glyco)proteins in embryogenic and non-embryogenic cell lines of Caribbean pine. Comparison between phenotypes of stage one somatic embryos. *Plant Physiol Biochem*, 32, 137-147.

- Domon, J.M., Dumas, B., Lainé, E., Meyer, Y., David, A., David, H. (1995) Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. *Plant Physiol*, 108, 141-148.
- Dong, J.Z., Dunstan, D.I. (1996-a) Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta*, 199, 459-466.
- Dong, J.Z., Dunstan, D.I. (1996-b) Characterization of three heat-shock-protein genes and their developmental regulation during somatic embryogenesis in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta*, 200, 85-91.
- Dong, J.Z., Dunstan, D.I. (1997) Characterization of cDNAs representing five abscisic acid-responsive genes associated with somatic embryogenesis in *Picea glauca*, and their responses to abscisic acid stereostructure. *Planta*, 203, 448-453.
- Dong, J.Z., Dunstan, D.I. (1999) Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 39, 859-864.
- Dos Santos, A.V.P., Cutter, E.G., Davey, M.R. (1983) Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. *Protoplasma*, 117, 107-115.
- Duban, M. (2000) Clonage et expression de gènes codant des récepteurs de type kinase au cours du processus d'induction de l'embryogenèse somatique de la chicorée. DEA GEBM, Lille.
- Dubois, T., Dubois, J., Guedira, M., Vasseur, J. (1988) Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoides. *C R Acad Sci, Paris*, 307, 669-675.
- Dubois, T., Guedira, M., Dubois, J., Vasseur, J. (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium* : Is callose an early marker? *Ann Bot*, 65, 539-545.

- Dubois, T., Guedira, M., Dubois, J., Vasseur, J. (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*, A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, 162, 120-127.
- Dupire, L., Décout, E., Vasseur, J., Delbreil, B. (1999) Histological and 2-D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L. *Plant Sci.*, 147, 9-17.
- Dure, L., Greenway, S.G., Galau, G.A. (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: Changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*, 20, 4162-4168.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H.D., Mondy, J., Quatrano, R., Thomas, T., Sung, Z.R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol*, 12, 475-486.
- Earnshaw, B.A., Johnson, M.A. (1987) Control of wild carrot somatic embryo development by antioxidants. *Plant Physiol*, 85, 273-276.
- Faure, O., Aarouf, J., Nougarède, A. (1996) Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.) : proembryogenesis. *Ann Bot*, 78, 23-28.
- Fellers, J.P., Guenzi, A.C., Porter, D.R. (1997) Marker proteins associated with somatic embryogenesis of wheat callus cultures. *J Plant Physiol*, 151, 201-208.
- Filipecki, M.K., Sommer, H., Malepszy, S. (1997) The MADS-box gene CUS1 is expressed during cucumber somatic embryogenesis. *Plant Sci*, 125, 63-74.
- Finstad, K., Brown, D.C.W., Joy, K. (1993) Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 34, 125-132.

- Franz, G., Hatzopoulos, P., Jones, T.J., Krauss, M., Sung, Z.R. (1989) Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, DC8, from *Daucus carota* L. *Mol Gen Genet*, 218, 143-151.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, D.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 8998-9002.
- Giroux, R.W., Pauls, K.P. (1996) Characterization of embryogenesis-related proteins in alfalfa (*Medicago sativa*). *Physiol Plant*, 96, 585-592.
- Giroux, R.W., Pauls, K.P. (1997) Characterization of somatic embryogenesis-related cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 33, 393-404.
- Gray, D., Purohit, A. (1991) Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10, 33-61.
- Guedira, M., Dubois-Tylski, T., Vasseur, J., Dubois, J. (1989) Embryogénèse somatique directe à partir de cultures d'anthères du *Cichorium* (Asteraceae). *Can J Bot*, 67, 970-976.
- Guedira, M., Dubois, T., Dubois, J., Vasseur, J. (1990) Influence du saccharose sur le rendement, la morphologie et le développement des embryons somatiques chez *Cichorium*. *C R Acad Sci, Paris*, 310, 453-459.
- Györgyey, J., Gartner, A., Nemeth, K., Magyar, Z., Hirt, H., Herberle-Bors, E., Dudits, D. (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 16, 999-1007.
- Hahne, G., Mayer, J.E., Lörz, H. (1988) Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Sci*, 55, 267-279.
- Halperin, W., Jensen, W.A. (1967) Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J Ultrastruct Res*, 18, 428-443.

- Heirwegh, K.M.G., Banerjee, N., Van Nerum, K., De Langhe, E. (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cichorium intybus* L. (Witloof, Compositae). *Plant Cell Rep*, 4, 108-111.
- Helleboid, S., Couillerot, J.P., Hilbert, J.L., Vasseur, J. (1995) Inhibition of direct somatic embryogenesis by α -difluoromethylarginine in a *Cichorium* hybrid : effects on polyamine content and protein patterns. *Planta*, 196, 571-576.
- Helleboid, S., Bauw, G., Belingheri, L., Vasseur, J., Hilbert, J.L. (1998) Extracellular β -1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta*, 205, 56-63.
- Helleboid, S., Hendriks, T., Bauw, G., Inze, D., Vasseur, J., Hilbert, J.L. (2000a) Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *J Exp Bot*, 51, 1189-2000.
- Helleboid, S., Chapman, A., Hendriks, T., Inze, D., Vasseur, J., Hilbert, J.L. (2000b) Cloning of β -1,3-glucanases expressed during *Cichorium* somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 0, 1-10.
- Heller, R. (1953) Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci Nat Bot Biol Vég*, 14, 913-922.
- Hendriks, T., Scheer, I., Quillet, M.C., Randoux, B., Delbreil, B., Vasseur, J., Hilbert, J.L. (1998) A nonsymbiotic hemoglobin gene is expressed during somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1443, 193-197.
- Hilbert, J.L., Dubois, T., Vasseur, J. (1992) Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiol Biochem*, 30, 733-741.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C., Becana, M. (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol*, 116, 173-181.

- Kairong, C., Gengsheng, X., Xinmin, L., Gengmei, X., Yafu, W. (1999) Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci*, 146, 9-16.
- Kitamiya, E., Suzuki, S., Sano, T., Nagata, T. (2000) Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep*, 19, 551-557.
- Klinedinst, S., Pascuzzi, P., Redman, J., Desai, M., Arias, J. (2000) A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. *Plant Mol Biol*, 42, 679-688.
- Kreuger, M., Vanholst, G.J. (1995) Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 197, 135-141.
- Laparra, H., Stoeva, P., Ivanov, P., Hahne, G. (1997) Plant regeneration from different explants in *Helianthus smithii* Heiser. *Plant Cell Rep*, 16, 692-695.
- Levéé, V., Garin, E., Klimaszewska, K., Séguin, A. (1999) Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Breed*, 5, 429-440.
- Liang, P., Pardee, A.B. (1992) Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-971.
- Lin, X., Hwang, G.J.H., Zimmerman, J.L. (1996) Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. *Plant Physiol*, 112, 1365-1374.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T.P., Benito, M.I., Town, C.D., Fujii, C.Y., Mason, T., Bowman, C.L., Barnstead, M., Feldblyum, T., Buell, C., Ketchum, K.A., J., L., Ronning, C.M., Koo, H.L., Moffat, K.S., Cronin, L.A., Shen, M., Pai, G., van Aken, S., Umayam, L., Tallon, L.J., Gill, J.E., Venter, J.C.*et al.* (2000) A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol*, 124, 1105-1120.

- Linskens, M.H.K., Tonkin, L.A., Saati, S.M. (1998) Enhanced differential display: A reproducible method for the analysis of differential gene expression. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook, 4, 275-280, ed. Academic Press Inc, San Diego, CA
- Lucas, W.J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesma. *Science*, 270, 1980-1983.
- Luo, J.P., Jiang, S.T., Pan, L.J. (2001) Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H₂O₂-metabolizing enzyme activities. *Plant Sci*, 161, 125-132.
- Luo, Y.K., Koop, H.U. (1997) Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta*, 202, 387-396.
- Malhotra, K., Foltz, L., Mahoney, W.C., Schueler, A. (1998) Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 20, 4965-4970.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. ed. Cold Spring Harbor, N.Y. ISBN 0-87969-136-0.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M.K., Warholm, M., Jörnvall, H. (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 7202-7206.
- Mannervik, B., U.H., D. (1988) Glutathione transferase: structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23, 283-337.
- Marrs, K.A. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 127-158.

- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., van Montagu, M., Inze, D. (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot*, 49, 649-667
- McGonigle, B., Keeler, S.J., Lau, S.M.C., Koeppe, M.K., O'Keefe, D. (2000) A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol*, 124, 1105-1120.
- Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M. (1991) Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J*, 274, 409-414.
- Michaux-Ferrière, N., Grout, H., Carron, M.P. (1992) Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Am J Bot*, 79, 174-180.
- Miele, G., MacRae, L., McBride, D., Manson, J., Clinton, M. (1998) Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *Biotechniques*, 25, 138-144
- Momiyama, T., Afele, J.C., Saito, T., Kayano, T., Tabei, Y., Takaiwa, F., K., T., Nishimura, S. (1995) Differential display identifies developmentally regulated genes during somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biochem Biophys Res Comm*, 213, 376-382.
- Morel, G., Wetmore, R.H. (1951) Fern callus tissue culture. *Ann Bot*, 56, 619-630.
- Morrew, F., (1998) Effets de préconditionnements des plantes de *Cichorium* sur l'embryogenèse somatique. DEA GEBM, Lille.
- Mullineaux, P., Ball, L., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G., Karpinski, S. (2000) Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Phil Trans R Soc Lond B*, 355, 1531-1540.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Nehls, U., Beguiristain, T., Ditengou, F., Lapeyrie, F., Martin, F. (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta*, 207, 296-302.
- Neuefeind, T., Huber, R., Reinemer, P., Knablein, J., Prade, L., Mann, K., Bieseler, B. (1997) Cloning, sequencing, crystallization and x-ray structure of glutathione S-transferase-III from *Zea mays* var. mutin: A leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *J Mol Biol*, 274, 577-587.
- Nielsen, K.A., Hansen, I.B. (1992) Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol*, 139, 489-497.
- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 249-279.
- Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H. (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot*, 49, 623-647.
- Nomura, K., Komamine, A. (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol*, 79, 988-991.
- Pennell, R.I., Janniche, L., Scofield, G.N., Booij, H., De Vries, S.C., Roberts, K. (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J Cell Biol*, 119, 1371-1380.
- Pickett, C.B., Lu, A.Y.H. (1989) Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem*, 58, 743-764.

- Polidoros, A.N., Scandalios, J.G. (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant*, 106, 112-120.
- Puupponen-Pimiä, R., Saloheimo, M., Vasara, T., Ra, R., Gaugecz, J., Kurten, U., Knowles, J.K.C., Keränen, S., Kauppinen, V. (1993) Characterization of a birch (*Betula pendula* Roth.) embryogenic gene, BP8. *Plant Mol Biol*, 23, 423-428.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., Milrad de Forchetti, S., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol*, 122, 1119-1127.
- Racusen, R.H., Schiavone, F.M. (1988) Detection of spatially- and stage-specific proteins in extracts from single embryos of domesticated carrot. *Development*, 103, 665-674.
- Reuber, T.L., Ausubel, F.M. (1995) Differential mRNA display. In: *Methods in cell biology*, 49, 431-440, ed. Academic Press Inc.
- Robatche Claive, A.S., Couillerot, J.P., Dubois, J., Dubois, T., Vasseur, J. (1992) Embryogenèse somatique directe dans les feuilles du *Cichorium* hybride '474' : synchronisation de l'induction. *C R Acad Sci, Paris*, 314, 371-377.
- Rossini, L., Frova, C., Mizzi, L., Gorla, M.S. (1998) Alachlor regulation of maize glutathione S-transferase genes. *Pestic Biochem Physiol*, 60, 205-211.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P. (1998) Regeneration of a metal tolerant grass *Echinochloa colona* via somatic embryogenesis from suspension culture. *Biol Plant*, 40, 17-23.
- Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R., Allen, R.D. (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol*, 41, 1229-1234.

- Šamaj, J., Baluska, F., Bobak, M., Volkmann, D. (1999) Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant Cell Rep*, 18, 369-374.
- Sattelmacher, B., Mühlhling, K.H., Pennewiss, K. (1998) The apoplast-its significance for the nutrition of higher plants. *Z Pflanzenernähr Bodenk*, 161, 485-498.
- Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*, 101, 7-12.
- Schmidt, E.D.L., Guzzo, F., Toonen, M., De Vries, S.C. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124, 2049-2062.
- Scholze, C., Peterson, A., Diettrich, B., Luckner, M. (1999) Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*. Sequences and expression during embryogenesis and stress. *J Plant Physiol*, 155, 212-219.
- Shah, K., Schmidt, E.D.L., Vlak, J.M., DeVries, S.C. (2001) Expression of the *Daucus carota* somatic embryogenesis receptor kinase (DcSERK) protein in insect cells. *Biochimie*, 83, 415-421.
- Somleva, M.N., Schmidt, E.D.L., De Vries, S.C. (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep*, 19, 718-726.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., Van Kammen, A., De Vries, S.C. (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3, 907-921.
- Stirn, S., Jacobsen, H.-J. (1987) Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep*, 6, 50-54.
- Stirn, S., Mordhorst, A.P., Fuchs, S., Lorz, H. (1995) Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regenerative capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cell cultures. *Plant Sci*, 106, 195-206.

- Sung, Z.R., Okimoto, R. (1981) Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 3683-3687.
- Sung, Z.R., Okimoto, R. (1983) Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 2661-2665.
- Takahashi, Y., Kuroda, H., Tanaka, T., Machida, Y., Takebe, I., Nagata, T. (1989) Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G0 to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc Natl Sci USA*, 86, 9279-9283.
- Takahashi, Y., Nagata, T. (1992) parB : an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 56-59.
- Takahashi, Y., Hasezawa, S., Kusaba, M., Nagata, T. (1995) Expression of the auxin-regulated parA gene in transgenic tobacco and nuclear localization of its gene products. *Planta*, 196, 111-117.
- Talas-Ogras, T., Kazan, K., Gözükmizi, N. (2001) Decrease peroxidase activity in transgenic tobacco and its effect on lignification. *Biotech Lett*, 23, 234-273.
- Tausz, M., Grill, D. (2000) The role of glutathione in stress adaptation of plants. *Phyton (Austria)*, 40, 111-118.
- Toonen, M.A.J., Hendriks, T., Schmidt, E.D.L., Verhoeven, H.A., Van Kammen, A., De Vries, S.C. (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures video cell tracking. *Planta*, 194, 565-572.
- Toonen, M.A.J., Schmidt, E.D.L., Hendriks, T., Verhoeven, H.A., Vankammen, A., De Vries, S.C. (1996) Expression of the JIM8 cell wall epitope in carrot somatic embryogenesis. *Planta*, 200, 167-173.
- Toonen, M.A.J., Verhees, J.A., Schmidt, E.D.L., Van Kammen, A., De Vries, S.C. (1997) AtLTP1 luciferase expression during carrot somatic embryogenesis. *Plant J*, 12, 1213-1221.

- Torelli, A., Soragni, E., Bolchi, A., Petrucco, S., Ottonello, S., Branca, C. (1996) New potential markers of *in vitro* tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. *Plant Mol Biol*, 32, 891-900.
- Towbin, H., Staehelin, T.V., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4350-4353.
- Trigiano, R.N., Gray, D.J., Conger, B.V., McDaniel, J.K. (1989) Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot Gaz*, 150, 72-77.
- Van Engelen, F.A., De Vries, S.C. (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet*, 8, 66-70.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H. (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol*, 117, 1103-1114.
- Vasil, I.K., A.C., H., Riker, A.J. (1964) Endive plantlets from freely suspended cells and cell groups grown *in vitro*. *Science*, 146, 76-77.
- Vasil, V., Redway, F., Vasil, I.K. (1990) Regeneration of plant from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat. *Biotechnology*, 8, 429-434.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., van Montagu, M., Inze, D., May, M.J., Sung, Z.R. (2000) The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell*, 12, 97-110.
- Vögeli-Lange, R., Bürckert, N., Boller, T., Wiemken, A. (1996) Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Res*, 24, 1385-1386.

- Wan, J.S., Erlander, M.G. (1997) Cloning differentially expressed genes by using differential display and subtractive hybridization. In: *Methods in Molecular Biology*, 85, 45-68, ed. Liang, P. & Pardee, A.B. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Wenck, A.R., Quinn, M., W., W.R., Pullman, G., Sederoff, R. (1999) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Mol Biol*, 39, 407-416.
- Wilde, H.D., Nelson, W.S., Booij, H., De Vries, S.C., Thomas, T.L. (1988) Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta*, 176, 205-211.
- Wu, J., Omokawa, H., Hatzios, K.K. (1996) Glutathione S-transferase activity in unsafened and fenclorim-safened rice (*Oriza sativa*). *Pestic Biochem Physiol*, 54, 220-229.
- Wurtele, E.S., Wang, H., Durgerian, S., Nikolau, B.J., Ulrich, T.H. (1993) Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol*, 102, 303-312.
- Yu, M., Facchini, P.J. (2000) Molecular cloning and characterization of a type III glutathione S-transferase from cell suspension cultures of opium poppy treated with a fungal elicitor. *Physiol Plant*, 108, 101-109.
- Zhao, S., Ooi, S.L., Yang, F.C., Pardee, A.B. (1996) Three methods for identification of true positive cloned cDNA fragments in differential display. *BioTechniques*, 20, 400-404.
- Zimmerman, J.L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5, 1411-1423.
- Zivy, M. (1986) Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent. In: *Recent Progresses in Two-Dimensional Electrophoresis*, pp. 69-72, Galteau, M.M., Siest, G., ed. Presses Universitaires de Nancy, Nancy