

COMPLEJO ENZIMÁTICO CITOCROMO P450 monooxigenasa EN PLANTAS*

CYTOCHROM P450 monooxygenase enzymatic complex IN PLANTS

Daniel González Mendoza^{1§}

¹Departamento de Recursos del Mar, Laboratorio de Ecotoxicología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida, km 6 antigua carretera a Progreso, C. P. 97310, Mérida, Yucatán, México. [§]Autor para correspondencia: danielg@mda.cinvestav.mx.

RESUMEN

El complejo enzimático citocromo P450 monooxigenasa se caracteriza por presentar un grupo Hemo y máxima absorción de luz a los 450 nm. El P450 se encuentra en distintos órganos de las plantas en bajas concentraciones, desempeña funciones en la biosíntesis de diversos metabolitos como ácidos grasos, fenilpropanoides, alcaloides y terpenoides. Además, participa en los procesos de producción de metabolitos de defensa y transformación de herbicidas. El empleo de técnicas moleculares, ha permitido la inserción de genes del P450 de mamíferos en vegetales, para favorecer la tolerancia a herbicidas. La presente aportación es una revisión bibliográfica sobre el potencial biotecnológico del complejo enzimático P450.

Palabras clave: biosíntesis de metabolitos, herbicida, planta, tolerancia.

ABSTRACT

The enzymatic complex cytochrome P450 monooxygenase main characteristics are to have a Hemo group and a maximum absorption at 450 nm. The P450 is found at low concentrations in different plant structures carrying out functions in the biosynthesis of fatty acids, phenylpropanoids,

alkaloids and terpenoides. Additionally, the P450 complex participates in the production of substances of defense and transformation of herbicides. The use of molecular techniques, has allowed the insertion of genes of P450 complex of mammals into plants, favoring herbicide tolerance. The present contribution is a bibliographic review of the biotechnological potential of the enzymatic complex cytochrome P450 monooxygenase.

Key words: metabolite biosynthesis, herbicides, plant, tolerance.

INTRODUCCIÓN

El citocromo monooxigenasa P450 (P450) es un conjunto de proteínas que presentan un grupo Hemo, se caracterizan por utilizar el NADPH o NADP⁺ para reducir el oxígeno molecular hasta H₂O y la incorporación de un átomo de O₂ al sustrato. El P450 puede presentar una masa molecular entre 45 y 62 kD y tiene a la hemo-ferriproteoporfirina IX como grupo prostético. Estas proteínas también se caracterizan por tener un espectro de absorbencia máxima a los 450 nm debido a la reducción de los enlaces de la hemoproteína (Fe⁺²) y la unión a una molécula de monóxido de carbono (Omura

* Recibido: Febrero, 2008
Aceptado: Febrero, 2009

y Sato, 1964). Es importante considerar que el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular e inmunohistoquímica han permitido localizar específicamente al P450 en las células (Chaban *et al.*, 2003; Humphreys y Chapple, 2004). Por otra parte, en estudios realizados en el genoma de *Arabidopsis* como planta modelo se han determinado 270 genes pertenecientes a 45 distintas familias del P450 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>); adicionalmente, estudios filogenéticos realizados entre reinos demostraron que el P450 de plantas se deriva de un gen ancestral común entre los distintos organismos (Nelson, 1999).

Presencia del CYP450 en plantas

La localización subcelular del complejo P450 en las plantas no es tan específica como en los mamíferos ya que es posible encontrarlo en el retículo endoplasmático y membrana plasmática (Kjellbom *et al.*, 1985), la vacuola (Madyastha *et al.*, 1977), mitocondria y aparato de Golgi (Donaldson y Luster, 1991). La mayoría de los genes aislados de CYP450 han sido obtenidos de plantas en diferentes estados de desarrollo al ser sometidas a distintos tipos de estrés.

Es importante mencionar que el estudio de los genes del CYP450 en plantas presenta ciertas limitaciones debido a la dificultad de aislar el ARNm mensajero y las proteínas ya que se encuentran en bajas concentraciones en los tejidos (Bilodeau *et al.*, 1999).

Nomenclatura del P450

Al referirse al citocromo P450, se recomienda emplear el término "P450" en lugar del "P-450". Para designar el nombre de los genes del P450 de manera sistemática, se incluyen las letras CYP por citocromo P450. La relación entre los P450 se determina con base en la similitud con la secuencia de aminoácidos. Los nombres de las familias del P450 se asignan cronológicamente siguiendo la determinación de la secuencia primaria de la proteína. Si la secuencia de aminoácidos de un nuevo P450 presenta 40% de identidad con proteínas de P450 conocidas, son incluidas en la misma familia y aquellas con más de 55% de identidad, son incluidas en la misma subfamilia. Por otra parte si la nueva secuencia presenta una identidad menor de 40% con las secuencias de las proteínas del P450 conocidas se genera una nueva familia. A los genes individuales se les asigna un número arbitrario (Nelson *et al.*, 1996). Por ejemplo, CYP2E1 y CYP4A1 pertenecen a diferentes familias, la 2 y

4. En el caso de los CYP4A1 y CYP4A2, ambos pertenecen a la familia 4, subfamilia A siendo dos enzimas diferentes, la 4A1 y 4A2. En el caso de que los P450 de una familia presenten menos de 55% de identidad, se les designa como miembros de dos subfamilias, ej. CYP74A y CYP74B (Chapple, 1998).

Función del CYP450 en plantas

El CYP450 generalmente controla reacciones que incluyen procesos de hidroxilación, de alquilación, deaminación, formación de sulfóxidos, dehalogenación y ruptura de enlaces C-C. En las plantas, los CYP450 están envueltos en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos tales como esteroides, terpenos, avonoides, ácidos grasos, alcaloides, fenilpropanoides y glucósidos cianogénicos (Durst, 1991). Además, participan en la destoxificación de herbicidas (Bolwell *et al.*, 1994). Adicionalmente, el CYP450 participan en procesos oxidativos del kaureno y en la hidroxilación del ácido 7 α -kaurenoico en la biosíntesis de giberelinas, en el catabolismo oxidativo del ácido abscísico (Hedden y Kamiya, 1997; Krochko *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2004) y en la biosíntesis de brasinoesteroides (Fujioka y Yokota, 2003).

Función de las familias del CYP450 en plantas

Entre las familias de P450 presentes en plantas, el CYP73 pudo haber tenido particular relevancia en la evolución de plantas vasculares ya que los miembros de dicha familia están involucrados en la síntesis de lignina y de diversos compuestos de defensa contra insectos y patógenos. Lo anterior, debido a que catalizan la hidroxilación del ácido *trans*-cinámico a ácido *p*-cumárico, lo cual es un paso clave para la formación de metabolitos endógenos (Schoch *et al.*, 2003). Por su parte genes de enzimas de la familia CYP90 y CYP85 participan en la biosíntesis de brasinosteroides (BRs) catalizando reacciones de oxidación en el C-6 del campesterol (Clouse y Sasse, 1998). Por ejemplo, en *Arabidopsis* el CYP90B1 y CYP90A1 son responsables de la hidroxilación de la cadena de esteroides C-22 y C-23, mientras que el CYP85A1 cataliza la oxidación del C-6 de intermediarios 6 deoxo. También, se ha reportado la participación de las subfamilias CYP734A1 y CYP72C1 en la regulación de los niveles endógenos de brasinosteroides (Takahashi *et al.*, 2005). Recientemente, se determinó la participación del gen D11 el cual codifica un nuevo citocromo P450 (CYP724B1), que presenta

gran similitud con las enzimas P450 que participan en la biosíntesis de BRs, aunque su participación aún no está totalmente establecida (Tanabe *et al.*, 2005).

En el caso de la biosíntesis de fenilpropanoides se ha observado que genes de la familia CYP73A5 en *Arabidopsis* y genes de la familia CYP73A9v1, y CYP82A1v1 en *Pisum sativum* son necesarios para la biosíntesis de compuestos fenólicos contra patógenos (Urban *et al.*, 1997; Whitbred y Schuler, 2000).

Por otra parte, Schopfer y Ebel (1998) empleando la técnica del gen diferencial, determinaron la participación de diversas enzimas del CYP450 en la biosíntesis de gliceolina (compuesto fenólico de defensa). Es importante mencionar, que estos genes codifican la cinamato4-hidrolasa (CH4) que regula la conversión de ácido *trans*-cinámico a ácido *p*-cumárico y fue la primera proteína observada en extractos celulares de *Pisum sativum* con las características del CYP450 de mamíferos (Russell y Conn, 1967). En el caso de los isoflavonoides una subclase de los fenilpropanoides, principalmente localizados en legumbres (Dixon y Sumner, 2003), se han identificado tres nuevos genes (CYP81E7, CYP81E9 y CYP81E7) a partir del cDNA de raíz de *Medicago truncatula* (Liu *et al.*, 2003), así como la participación de la subfamilia CYP93C y CYP93C2 (Sawada *et al.*, 2002) en donde todos estos genes son claves para la generación de isoflavonoides durante la interacción con agentes patógenos.

Los genes pertenecientes a la subfamilia CYP88A participan en la biosíntesis de las giberelinas (GA) ya que catalizan la transformación del kaureno a GA₁₂ via *ent*-7 α -hydroxy-ácido kaurénico y GA₁₂-aldehído, de acuerdo a lo observado en *Arabidopsis*, *Hordeum vulgare* (Davidson *et al.*, 2003). También se han aislado otros genes pertenecientes a la familia CYP88A en *Cucurbita maxima* (Helliwell *et al.*, 2000) y *Zea mays* L. (Winkler y Helentjaris, 1995).

En el caso de los sesquiterpenoides que desempeñan funciones de defensa contra patógenos la familia CYP706 regula pasos importantes de la biosíntesis de estos compuestos. Por ejemplo en algodón se ha observado que el gen CYP706B1, es un factor clave para la sobre producción del gossipol (sesquiterpenoides) en plantas de *Gossypium* spp. al estar en contacto frente a bacterias patógenas (Luo *et al.*, 2001).

En la biosíntesis de alcaloides indólicos se ha observado que el gen de la subfamilia CYP72A1 proveniente de *Catharanthus roseus* tiene una función importante en la biosíntesis de estos compuestos (ej. regula la conversión del segolina a secologanina) (Irmeler *et al.*, 2000).

En trabajos realizados por Mujery Smigocki (2001) en *C. roseus* se observó un gen de la subfamilia CYP72A2 que participa en la regulación de la biosíntesis de citoquininas durante el ataque de *Nicotiana plumbaginifolia* (insecto patógeno).

La presencia de genes del P450, también, se han observado durante el proceso de maduración de frutos, por ejemplo en aguacate se identificó la inducción de CYP71A1 durante los procesos de maduración a partir del análisis de cDNA Bozak *et al.* (1999). Por otra parte, se identificó una nueva familia de CYP450 en *Musa acuminata* cv. Williams denominada MAP450-1 la cual presenta alrededor de 27 a 45% de similitud con la secuencia de aminoácidos de CYP71A1, lo cual permitió clasificarla como CYP71N1; su presencia en frutos se atribuye a la acción del etileno o sacarosa, descartando su participación directa en la maduración del fruto (Pua y Lee, 2003).

En cuanto a la función del CYP450 como agente de señalización se ha reportado que la subfamilia CYP74A participan en procesos de hidroxiperización de ácidos grasos, generando oxilipinas, las cuales tienen entre otras funciones, la de señalización en la producción de compuestos de defensa contra insectos (Noordermeer *et al.*, 2001; Weber, 2002). Adicionalmente, la subfamilia CYP74B participa en la generación de compuestos como la taumatina y aldehídos volátiles que afectan la fecundidad de insectos y actúan como moléculas señal en heridas de plantas (Bate *et al.*, 1998). Es importante mencionar que estas subfamilias se localizan principalmente en tejidos fotosintéticos, teniendo como sustrato principal a 13-hidroxiperoxidos, localizados principalmente en plástidos (Froehlich *et al.*, 2001). Existen otras subfamilias como las CYP74C y CYP74D que se localizan en el sistema radical y tejidos no fotosintéticos, cuya función no es muy clara en los procesos de defensa (Morant *et al.*, 2003).

Herbicidas

En ciertas especies vegetales el CYP450 tiene la capacidad de metabolizar herbicidas, esto se ha observado en soya en donde el CYP71A10 metaboliza el linurón y clortolurón; en

tabaco, CYP81B2 y CYP71A11 provocan la hidroxilación y dimetilación del clortolurón. También, se ha observado la capacidad de CYP71B1, CYP73A1, CYP76B1 y CYP81B1 de metabolizar herbicidas, principalmente clortolurón (Robineau *et al.*, 1998; Siminszky *et al.*, 1999; Werck-Reichhart *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2000). En estudios recientes se ha mencionado la posible participación del CYP450 en la degradación de atrazina mediante procesos de dealquilación en plantas de *Chrysopogon zizanioides* Nash; sin embargo, se ha observado que el mecanismo de mayor importancia en la degradación es vía glutatión S-transferasa (Marcacci *et al.*, 2006). En el caso de la tolerancia al rimsulfuron en *Zea mays* L. se ha observado que el CYP450 tiene una función clave en la rápida transformación del herbicida (Koeppel *et al.*, 2000). Por otra parte existen herbicidas que pueden generar una inhibición de la actividad enzimática del CYP450, esto se ha observado en proteínas del CYP71B1 en *Thlaspi arvensae* al ser expuesto a 12 μ M de glifosato (Lamb *et al.*, 1998).

El CYP450 de mamíferos para incrementar la tolerancia a herbicidas en plantas

Con el objetivo de incrementar la tolerancia a herbicidas en plantas de interés agronómico se les han introducido genes CYP450 de mamíferos mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, en plantas de tabaco transformadas con el gen CYP4501A1 de ratas, se observó mayor producción de metabolitos no fitotóxicos, lo cual incrementó la tolerancia al clortolurón al compararse con plantas no transformadas (Shiota *et al.*, 1994).

En el cultivo de papa, se ha observado que la inserción del gen CYP4501A1 de rata vía *Agrobacterium*, induce una mayor metabolización del herbicida fenilurea a través de la N-dimetilación y P-metil hidroxilación, lo cual incrementa la tolerancia de la planta (Inui *et al.*, 1998). Resultados similares han sido reportados en plantas transgénicas de *Oryza sativa* que expresan al CYP2C9 y CYP2C19 de humanos al ser expuestas a distintos herbicidas (Inui *et al.*, 2001). En el caso del gen CYP1A1 presente en humanos, se ha observado que su inserción en *Oryza sativa* cv. Nipponbare le confiere mayor tolerancia a una gran variedad de herbicidas (ej. etil-quiazalofop; norflurazón; mefenacet; atrazina y clortolurón) debido a que estimula la absorción y transformación de los xenobioticos, lo que resulta en un incremento de metabolitos que son eliminados a través de exudados radicales (Kawahigashi *et al.*, 2003).

Resultados similares han sido observados con la inserción de genes de citocromo humano CYP1A1, CYP2B6 y CYP2C19, por medio del plásmido pIKBACH en *O. sativa* cv. 'Nipponbare' en donde se incrementó la tolerancia a una amplia gama de herbicidas con distintos efectos fisiológicos en plantas, lo cual permite proponer la obtención de plantas modificadas con el plásmido pIKBACH, para ser empleadas en el proceso de fitoremediación (Kawahigashi *et al.*, 2005). Sin embargo, es importante tomar en cuenta que la expresión de los genes CYP1A1, CYP2B6 y CYP2C19 no incrementan la tolerancia de *O. sativa* a etofumasato y benfuresato (Kawahigashi *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

El complejo enzimático del citocromo P450 incluye una amplia familia de genes con diversidad de funciones de importancia para el óptimo desarrollo fisiológico. Así como en la biosíntesis *de novo* de metabolitos importantes en los procesos de defensa y señalización contra organismos patógenos y en procesos de transformación de herbicidas.

El CYP450 de plantas representa una super familia que mantiene una rápida evolución molecular debido a las exigencias bioquímicas derivadas de la coevolución con organismos patógenos y herbívoros, así como a factores ambientales.

La inserción de genes del CYP450 de mamíferos en plantas de interés agronómico amplía la posibilidad de desarrollar plantas transgénicas con fines de fitoremediación o bien para incrementar la tolerancia a herbicidas.

LITERATURA CITADA

- Bate, N. and Rothstein, S. J. 1998. C6-volatiles derived from the lipooxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.* 16:561-569.
- Bilodeau, P.; Udvardi, M. K.; Peacock, W. J. and Dennis, E. S. 1999. A prolonged cold treatment-induced cytochrome P450 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 22:791-800.
- Bozak, K.; Yu, H.; Sirevåg, R. and Christoffersen, R. E. 1999. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3904-3908.

- Bolwell, G. P.; Bozak, K. and Zimmerlin, A. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*. 37:1491-1506.
- Chaban, C.; Waller, F.; Furuya, M. and Nick, P. 2003. Auxin responsiveness of a novel cytochrome P450 in rice coleoptiles. *Plant Physiol.* 133:2000-2009.
- Chapple, C. 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Plant Mol. Biol.* 49:311-343.
- Clouse, S. D. and Sasse, J. M. 1998. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 49:427-451.
- Davidson, E. S.; Elliott, R.; Helliwell, C.; Poole, A. and Reid, J. 2003. The pea gene *NA* encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase1. *Plant Physiol.* 131:335-344.
- Dixon, R. A. and Sumner, L. W. 2003. Legume natural products. Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* 131:878-885.
- Donaldson, R. P. and Luster, D. G. 1991. Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol.* 96:669-674.
- Durst, F. 1991. Biochemistry and physiology of plant cytochrome P-450. *In*: microbial and plant cytochromes P-450: biochemical characteristics, genetic engineering and practical implications (K. Ruckpaul, H. Rein, Ed.). Akademie- Verlag, Berlin, pp. 191-232.
- Froehlich, J. E.; Itoh, A. and Howe, G. A. 2001. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 125:306-317.
- Fujioka, S. and Yokota, T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:137-164.
- Helliwell, C. A.; Chandler, P. M.; Poole, A.; Dennis, E. S. and Peacock, W. J. 2000. The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:2065-2070.
- Hedden, P. and Kamiya, Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Plant Mol Biol.* 48:431-460.
- Humphreys, J. M. and Chapple, C. 2004. Immunodetection and quantification of cytochromes P450 using epitope tagging: immunological, spectroscopic, and kinetic analysis of cinnamate 4-hydroxylase. *J. Immunol. Methods.* 292:97-107.
- Inui, H.; Shiota, N.; Ido, Y.; Inoue, T.; Hirose, S.; Kawahigashi, H.; Ohkawa, Y. and Ohkawa, H. 2001. Herbicide metabolism and tolerance in the transgenic rice plants expressing human CYP2C9 and CYP2C19. *Pest. Biochem. Physiol.* 71:156-169.
- Inui, H.; Shiota, N.; Ishige, T.; Ohkawa, Y. and Ohkawa, H. 1998. Herbicide metabolism and resistance of transgenic potato plants expressing rat cytochrome P4501A1. *Breeding Science.* 48:135-143.
- Irmeler, S.; Schröder, G.; St-Pierre, B.; Crouch, P.; Hotze, M.; Schmidt, J.; Strack, D.; Matern, U. and Schröder, J. 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.* 24:797-804.
- Kawahigashi, H.; Hirose, S.; Etsuko, H.; Ohkawa, H. and Ohkawa, Y. 2002. Phytotoxicity and metabolism of ethofumesate in transgenic rice plants expressing the human *CYP2B6* gene. *Pest Biochem. Physiol.* 74:139-147.
- Kawahigashi, H. S.; Hirose, H.; Inui, H. and Ohkawa, Y. 2005. Enhanced herbicide cross-tolerance in transgenic rice plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Plant Sci.* 168:773-781.
- Kawahigashi, H. S.; Hirose, H. and Ohkawa, Y. 2003. Transgenic rice plants expressing human CYP1A1 exude herbicide metabolites from their roots. *Plant Sci.* 165:373-381.
- Koepe, M. K.; Hirata, C. M.; Brown, H. M.; Kenyon, W. H.; O'Keefe, D. P.; Lau, S. C.; Zimmerman, W. T. and Green, J. M. 2000. Basis of selectivity of the herbicide rimsulfuron in maize. *Pest Biochem. Physiol.* 66:170-181.
- Kjellbom, P.; Larsson, C.; Askerlund, P.; Schelin, C. and Widell, S. 1985. Cytochrome P-450/420 in plant plasma membranes: a possible component of the blue-light-reducible flavoprotein-cytochrome complex. *Photochem. Photobiol.* 42:779-783.
- Krochko, J. E.; Abrams, G. D.; Loewen, M. K.; Abrams, S. R. and Cutler, A. J. 1998. Abscissic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol.* 118:849-860.
- Lamb, D. C.; Kelly, D. E.; Hanley, S. Z.; Mehmood, Z. and Kelly, S. L. 1998. Glyphosate is an inhibitor of plant cytochrome P450: functional expression of *Thlaspi arvensae* cytochrome P45071B1/reductase fusion protein in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:110-114.

- Liu Chang-Jun, D.; Huhman, W.; Sumner, L. and Dixon, R. 2003. Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome P45081E enzymes from *Medicago truncatula*. Plant J. 36:471-484.
- Luo, P.; Wang, Y.; Wang, G.; Essenberg, M. and Chen, X. 2001. Molecular cloning and functional identification of (+)- δ -cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. Plant J. 28:95-104.
- Marcacci, S.; Raveton, M.; Ravanel, P. and Schwitzguébel, J. 2006. Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. Environ. Exper. Bot. In Press, Corrected Proof. 52(2):205-215
- Madyastha, K. M.; Ridway, J. E.; Dwyer, J. G. and Coscia, C. J. 1977. Subcellular localization of a cytochrome P-450-dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*. J. Cell Biol. 72:302-313.
- Morant, M.; Bak, S.; Lindberg, M. B. and Werck-Reichhart, D. 2003. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. Curr. Opin. Biotechnology. 14:151-162.
- Mujer, V. and Smigocki, C. 2001. Cytokinin and wound-inducible cytochrome P450 from *Nicotiana plumbaginifolia*. Physiol. Plant. 111:172-178.
- Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J. J.; Feyereisen, R. and Waxman, D. J. 1996. Update of new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics. 6:1-42.
- Nelson, D. R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. Arch. Biochem. Biophys. 369:1-10.
- Noordermeer, M. A.; Veldink, G. A. and Vliegthart, J. F. 2001. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. Chembiochem. 2:494-504.
- Omura, T. and Sato, R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: II. Solubilization, purification and properties. J. Biol. Chem. 239:2379-2385.
- Pua, E. Ch. and Lee, Y. Ch. 2003. Expression of a ripening-related cytochrome P450 cDNA in cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams). Gene. 305:133-140.
- Robineau, T.; Batard, Y.; Nedelkina, S.; Cabello-Hurtado, F.; LeRet, M.; Sorokine, O.; Didierjean, L. and Werck-Reichhart, D. 1998. The chemical inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. Plant Physiol. 118:1049-1056.
- Russell, D. W. and Conn, E. E. 1967. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. Arch. Biochem. Biophys. 122:256-58.
- Saito, S.; Hirai, N.; Matsumoto, C.; Ohigashi, H.; Ohta, D.; Sakata, K. and Mizutani, M. 2004. Arabidopsis CYP707As Encode (+)-Absciscic Acid 8'-Hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. Plant Physiol. 134:1439-1449.
- Sawada, Y.; Kinoshita, K.; Akashi, T.; Aoki, T. and Ayabe, S. 2002. Key amino acid residues required for aryl migration catalysed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase. Plant J. 31:555-564.
- Siminszky, B.; Corbin, F. T.; Ward, E. J.; Fleischmann, T. J. and Dewey, R. E. 1999. Expression of a soybean P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:1750-1755.
- Shiota, N.; Nagasawa, A.; Sakaki, T.; Yabusaki, Y. and Ohkawa, H. 1994. Herbicide-resistant tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Plant Physiol. 106:17-23.
- Schoch, G. A.; Attias, R.; Le Ret, M. and Werck-Reichhart, D. 2003. Key substrate recognition residues in the active site of a plant cytochrome P450, CYP73A1. Homology model guided site-directed mutagenesis. EJB. 270:3684-3695.
- Schopfer, C. R. and Ebel, J. 1998. Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. Mol. Gen Genet. 258:315-22.
- Takahashi, N.; Nakazawa, M.; Shibata, K.; Takao, Y.; Akie, I.; Suzuki, K.; Kawashima, M.; Ichikawa, T.; Shimada, H. and Matsui, M. 2005. *shk1-D*, a dwarf *Arabidopsis* mutant caused by activation of the *CYP72C1* gene, has altered brassinosteroid levels. Plant J. 42:13-22.

- Tanabe, S.; Ashikari, M.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yoshida, S.; Yano, M.; Yoshimura, A.; Kitano, H.; Matsuoka, M.; Fujisawa, Y.; Kato, H. and Iwasaki, Y. 2005. A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, dwarf11, with reduced seed length. *Plant Cell*. 17:776-790.
- Urban, P.; Mignotte, C.; Kazmaier, M.; Delorme, F. and Pompon, D. 1997. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* 272:19176-86.
- Weber, H. 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* 7:217-224.
- Werck-Reichhart, D.; Hehn, A. and Didierjean, L. 2000. Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Pharmacol. Sci.* 5:116-123.
- Winkler, R. G. and Helentjaris, T. 1995. The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*. 7:1307-1317.
- Whitbred, J. M. and Schuler, M. A. 2000. Molecular characterization of *CYP73A9* and *CYP82A1* P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiol.* 124:47-58.
- Yamada, T.; Kambara, Y.; Imashi, H. and Ohkawa, H. 2000. Molecular cloning of novel cytochrome P450 species induced by chemical treatments in tobacco cells. *Pest Biochem. Physiol.* 68:11-25.