

EL COMPLEJO ENZIMÁTICO CITOCROMO P450 EN LAS PLANTAS

Daniel GONZÁLEZ-MENDOZA

Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano no. 1, Tlalpan, México DF., 14080, México. Tel: +5255 55732911, ext. 1422, 1298 Fax: +5255 55730926 y Departamento de Recursos del Mar, Laboratorio de Ecotoxicología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida, km 6, antigua carretera a Progreso, Mérida 97310 Yucatán, México. Correo electrónico: daniasaf@gmail.com

(Recibido enero 2007, aceptado octubre 2007)

Palabras clave: citocromo P450, plantas, herbicidas, tolerancia

RESUMEN

Las enzimas dependientes del citocromo P450 (CYP450) son importantes en la biosíntesis de diversas sustancias y en la desintoxicación de xenobióticos. En las plantas, estas enzimas participan en la biosíntesis de productos secundarios (e.g. flavonoides, alkaloides) y de hormonas, así como en la desintoxicación de herbicidas. Por otra parte, el empleo de técnicas moleculares ha permitido la inserción de genes del CYP450 de mamíferos en un mayor número de especies de plantas para favorecer la tolerancia a herbicidas. La presente aportación es una revisión bibliográfica sobre el potencial biotecnológico del complejo enzimático del CYP450.

Keywords: cytochrome P450, plants, herbicides, tolerance

ABSTRACT

Cytochrome P450 dependent enzymes (CYP450) are important in the biosynthesis of many substances and in the detoxification of xenobiotics. In plants, they are involved in the biosynthesis of secondary products (e.g. flavonoids, alkaloids) and hormones, but also in the detoxification of herbicides. On the other hand, the use of molecular techniques, has allowed the insertion of genes of the CYP450 of mammals in a greater number of plants, favoring the tolerance to herbicides. The present contribution is an overview of the biotechnological potentiality of the enzymatic complex CYP450.

INTRODUCCIÓN

El sistema de monooxigenasas conocido como citocromo P450 (CYP450) es un grupo de proteínas que presentan un grupo hemo, se caracterizan por utilizar el NADPH ó NADP⁺ para reducir el oxígeno molecular, hasta H₂O y la incorporación de un átomo

de O₂ al sustrato. El CYP450 posee una masa molecular entre 45 y 62 kD y tiene a la hemo-ferriproteo-porfirina IX como grupo prostético. Estas proteínas 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 con una molécula de monóxido de carbono (Omura y

Sato 1964). En años recientes, el uso de técnicas de biología molecular ha permitido identificar alrededor de 270 genes pertenecientes a 45 distintas familias del CYP450 en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, (planta modelo de laboratorio) (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) y demostrado a partir de estudios filogenéticos realizados entre los diferentes reinos que el CYP450 de las plantas se deriva de un gen ancestral común entre los distintos organismos (Nelson 1999).

Presencia del CYP450 en plantas

El uso de técnicas de biología molecular e inmunohistoquímicas ha permitido localizar específicamente al CYP450 en las células (Chaban *et al.* 2003, Humphreys y Chapple 2004). Sin embargo, la localización subcelular del complejo CYP450 en las plantas no es tan específica como en los mamíferos. Generalmente puede variar en su localización, por ejemplo es posible encontrarlo en el retículo endoplásmico, membrana plasmática, vacuola, mitocondria y aparato de golgi (Madyastha *et al.* 1977, Kjellbom *et al.* 1985, Donaldson y Luster 1991). En este contexto, es importante mencionar que la identificación y el aislamiento de los genes del CYP450 en plantas presenta ciertas limitaciones debido a la dificultad de aislar el ARN mensajero y las proteínas, ya que se encuentran en bajas concentraciones en los tejidos (Bilodeau *et al.* 1999). En las plantas, las familias de genes del CYP450 se inician con el CYP71 y terminan con el CYP99, en donde la mayoría de estos genes aislados han sido obtenidos en diferentes estados de desarrollo de las plantas sometidas a diferentes tipos de estrés biótico o abiótico (Chapple 1998).

Nomenclatura del P450

Cuando se trata del citocromo CYP450, es recomendable emplear el término "CYP450" en lugar de "CYP-450". Para designar el nombre de los genes del CYP450 de manera sistemática, se incluye las letras CYP por citocromo P450. En este sentido, la relación entre los CYP450 se determina con base en la similitud con la secuencia de aminoácidos. De tal forma, que los nombres de las familias del CYP450, son asignadas cronológicamente siguiendo la determinación de la secuencia primaria de la proteína. Si la nueva secuencia de aminoácidos del nuevo CYP450 presenta 40 % de identidad con proteínas de CYP450 conocidas, son incluidas en la misma familia y aquellas con más de 55 % de identidad, son incluidas en la misma subfamilia. No obstante, si la nueva secuencia presenta una identidad menor del 40% con las secuencias de las proteínas del CYP450

se genera una nueva familia (Chapple 1998). Por otra parte, a los genes individuales se les asigna un número arbitrario 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 (Nelson *et al.* 1996).

Función de las familias del CYP450 en las plantas

En plantas, la familia del CYP450 está involucrada en el metabolismo oxidante de compuestos endógenos tales como fenilpropanoides y glucósidos cianogénicos, los cuales tienen una función en los procesos moleculares de interacción planta-patógeno y en la defensa a nivel bioquímico en contra de predadores de las plantas, respectivamente (Durst 1991). Además participan en la desintoxicación de herbicidas mediante reacciones que incluyen procesos de hidroxilación, desalquilación, desaminación, formación de sulfóxidos y deshalogenación (Bolwell *et al.* 1994). Adicionalmente, en estudios recientes, diversos autores han reportado que la familia del CYP450 participa activamente en la biosíntesis de fitoreguladores de crecimiento como giberelinas, ácido abscísico y brasinoesteroides (Krochko *et al.* 1998, Fujioka y Yalota 2003, Saito *et al.* 2004). Esto indica la relevante importancia que tiene el complejo enzimático del CYP450 en el proceso evolutivo de la tolerancia de las plantas vasculares a factores bióticos y abióticos.

Entre los ejemplos de la función de las enzimas del CYP450 en las plantas se puede mencionar la participación de la familia del CYP73 en la formación de monómeros de lignina, protección a U.V., pigmentos contra ataques de insectos y compuestos de defensa (Schoch *et al.* 2003). En este sentido, estudios sobre los genes de la familia CYP73A5, CYP73A9v1 y CYP82A1v1 presentes en plantas de *Arabidopsis* sp. y *Pisum sativum* (chícharo), han demostrado su participación en la biosíntesis de los fenilpropanoides, estimulando la síntesis *de novo* de fitoalexinas y lignina, lo que incrementa la resistencia y tolerancia a patógenos (Urban *et al.* 1997, Whitbred y Schuler 2000), favoreciendo la disminución de las dosis requeridas de fungicidas o bactericidas en la producción de plantas de importancia alimentaria y estimulando prácticas agrícolas más sostenibles. Por su parte, trabajos realizados por Schopfer y Ebel (1998), en plantas de *Glycine max* (soya) demostraron la participación de diversos genes que codifican para enzimas del CYP450, las cuales participan en la síntesis de la enzima cinamato-4-hidrolasa (CH4) que regula la

conversión de ácido trans-cinámico a ácido p-cumárico (compuesto con actividad alelopática) y que es precursor de la gliceolina (compuesto fenólico de defensa contra patógenos).

En estudios realizados a nivel molecular en *Arabidopsis*, Clouse y Sasse (1998) y Takahashi *et al.* (2005) observaron que genes de enzimas de la familia CYP90A1, CYP85A1, CYP734A1 y CYP72C1 tienen una función en la biosíntesis de brasinoesteroides (BR) y en la regulación de los niveles endógenos de los BR en las plantas. Esto es importante ya que los BRs son compuestos polihidroxilados derivados del esterol y se encuentran ampliamente involucrados en la regulación de numerosos genes que controlan los procesos de crecimiento y desarrollo, así como también tienen una función en la respuesta a estrés biótico y abiótico, incluyendo estrés por salinidad, temperaturas extremas y ataque de patógenos (Clouse y Sasse 1998), por lo que el conocimiento de los genes del CYP450 que regulan la biosíntesis de este compuesto puede aportar información relevante para el mejoramiento genético de plantas. Por otra parte, en años recientes se ha identificado la participación del gen D11, el cual codifica un nuevo citocromo P450 (CYP724B1), que presenta una gran semejanza con las enzimas P450 que contribuyen en la biosíntesis de BR, sin embargo su función en la biosíntesis aún no está totalmente establecida (Tanabe *et al.* 2005). Por lo anterior, son necesarios estudios ulteriores para conocer de una forma completa, el modo de acción y el número de genes del CYP450 que participan en la biosíntesis de los BR en las plantas.

En el caso de la biosíntesis de las giberelinas (GA), Davidson *et al.* (2003) encontraron que la familia del CYP450 que actúa en la biosíntesis de este compuesto son las pertenecientes al CYP88A que catalizan la transformación del kaureno a GA₁₂ vía *ent-7 α* -hydroxy-ácido kaurénico y GA₁₂-aldehído, de acuerdo con lo observado en *Arabidopsis* y *Hordeum vulgare* (cebada). Resultados similares han sido reportado por Winkler y Helentjaris (1995) y Helliwell *et al.* (2000) en plantas de *Cucurbita maxima* (calabaza) y *Zea mays* (maíz). En el caso de los sesquiterpenoides que desempeñan funciones de defensa principalmente contra hongos y bacterias, se ha reportado que la familia CYP706 es la que regula pasos importantes en la biosíntesis de estos compuestos. Por ejemplo, se ha observado que en el algodón (*Gossypium* spp), el gen CYP706B1 es un factor clave para la sobreproducción del gopiol (sesquiterpenoide) al estar en contacto con bacterias patógenas (Luo *et al.* 2001).

Por otra parte, Irmiler *et al.* (2000) encontraron que para que se realice la biosíntesis de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus* (vicaria) es necesaria la presencia del gen del CYP72A1, ya que es un factor clave en la conversión del segolina a secologanina (metabolito de gran interés médico). Adicionalmente, en trabajos realizados por Mujer y Smigocki (2001) en *C. roseus*, se ha identificado un gen de la subfamilia CYP72A2 que participa en la regulación de la biosíntesis de citoquininas (fitohormonas que estimulan la división celular) durante la interacción con *Nicotiana plumbaginifolia* (insecto patógeno), en donde la citoquininas actúan inhibiendo el crecimiento de las larvas del insecto mediante la producción de metabolitos secundarios.

Una mayor inducción de genes del CYP450 también se ha observado durante el proceso de maduración de frutos, por ejemplo en aguacate se identificó la inducción del CYP71A1 durante los procesos de maduración a partir del análisis de cDNA (Bozak *et al.* 1990). Sin embargo, en *Musa acuminata* cv. Williams (plátano malayo) se identificó una nueva familia de CYP450 (MAP450-1) relacionada filogenéticamente con CYP71A1, en donde la presencia en los frutos es debida a la acción del etileno o de la sacarosa, descartando su participación directa en la maduración del fruto (Pua y Lee 2003). Estas dos proteínas presentan una semejanza del 27 al 45 % en la secuencia de sus aminoácidos, lo que ha permitido clasificar a MAP450-1 como CYP71N1.

En cuanto a la función del CYP450 como agente de señalización, se ha reportado que en la subfamilia CYP74A participa en procesos de hidroxiperoxidación de ácidos grasos, generando oxilipinas, las cuales tienen una función de señalización en la producción de compuestos de defensa contra insectos (Noordermeer *et al.* 2001, Weber 2002). Además, la subfamilia CYP74B participa en la generación de compuestos volátiles como la traumatina y aldehídos volátiles que actúan en el control biológico de los insectos mediante la inhibición de la fecundidad y como moléculas de señalización celular en heridas de plantas estimulando la síntesis de lignina (Bate *et al.* 1998).

Es importante mencionar que estas subfamilias se localizan principalmente en tejidos fotosintéticos, teniendo como sustrato principal al 13-hidroxiperoxido, localizado principalmente en los plástidos (Froehlich *et al.* 2001). Existen otras subfamilias como 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 contra patógenos (Morant *et al.* 2003).

Herbicidas y su efecto en el CYP450 de plantas

La tolerancia natural de ciertas plantas a herbicidas es algo sumamente importante. Esta tolerancia está basada principalmente en la habilidad diferencial de la especie vegetal para desintoxicar el herbicida, mediante la participación de las enzimas del CYP450 (Forthoffer 2001). La forma en que las enzimas del CYP450 inhiben la acción de los herbicidas es insertando un átomo de oxígeno en moléculas hidrofóbicas (en este caso herbicidas) transformándolos en moléculas hidrosolubles y por lo tanto de más fácil degradación (Werck-Reichhart 2000). Lo anterior ha sido observado en plantas de *Helianthus tuberosus* (girasol) y *Glycine max* (soya) en donde se identificó la presencia de tres genes CYP76B1, CYP73A1 y CYP71A10, que participan en el metabolismo de herbicidas del tipo de las sulfonilureas de forma eficiente (Siminszky 1999, Didierjean 2002). También, se ha observado la capacidad de CYP71B1, CYP73A1, CYP76B1 y CYP81B1 de metabolizar, el clortoluron, en plantas de tabaco (Yamada *et al.* 2000).

En estudios recientes también se ha determinado la posible participación del CYP450 presente en el pasto, *Chrysopogon zizanioides* Nash, en la degradación de atrazina mediante procesos de desalquilación (Marcacci *et al.* 2005).

En el caso de la tolerancia de *Zea mays* al rimsulfurón, se ha observado que el CYP450 tiene una función clave en la rápida transformación del herbicida (Koepe *et al.* 2000). Sin embargo, también se ha reportado que la actividad de enzimas del CYP450 de las plantas puede ser afectada por la dosis empleada de herbicidas; en este sentido, Lamb *et al.* (1998) mencionan la inhibición de las enzimas de la familia del CYP71B1 presente en la maleza *Thlaspi arvensae* cuando se expuso a 12 μ M de glifosfato. No obstante, la efectividad de las enzimas del CYP450 en la transformación de los herbicidas puede variar de acuerdo al tipo de planta, concentración y composición química del herbicida empleado, lo cual debe ser considerado en los trabajos de investigación.

Papel del CYP450 de mamíferos en la tolerancia a herbicidas

Con el objetivo de incrementar la tolerancia a herbicidas en plantas de interés agronómico, se ha realizado la inserción de fragmentos de genes del CYP450 de mamíferos mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, en plantas de tabaco transformadas con el gen CYP4501A1 de rata, se observó una mayor producción de metabolitos no fitotóxicos, lo cual incrementó su tolerancia

al clortolurón en comparación con las plantas no transformadas (Shiota *et al.* 1994).

En el caso de herbicidas como la fenilurea, se ha observado que la inserción del gen CYP4501A1 de rata en papa, genera una mayor biotransformación del herbicida a través de la *N*-dimetilación y *P*-metil hidroxilación, lo cual se refleja en un incremento de la tolerancia de la planta (Inui *et al.* 1998). Resultados similares han sido reportados en plantas transgénicas de *Oryza sativa* (arroz) 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 mamíferos, se ha observado que su inserción en *Oryza sativa* cv. Nipponbare confiere mayor tolerancia a gran variedad de herbicidas (por ej. etil-quizalofop, norflurazon, mefenacet, atrazina y clortolurum) observándose que la presencia del CYP1A1 en la planta estimula mayor absorción y transformación de los xenobióticos, resultando en un incremento de metabolitos que se eliminan a través de exudados radicales (Kawahigashi *et al.* 2003).

Por otra parte, se han observado resultados similares al insertar genes de los citocromos humanos CYP1A1, CYP2B6 y CYP2C19 en *O. sativa* cv. Nipponbare usando el plásmido pIKBACH generando incrementos en la tolerancia a una amplia gama de herbicidas con distintos efectos fisiológicos en las plantas, lo que permite proponer la generación de plantas modificadas con el plásmido pIKBACH, para ser empleadas en procesos de fitorremediación (Kawahigashi *et al.* 2005). Sin embargo, es importante tener en consideración que la expresión de los genes CYP1A1, CYP2B6 y CYP2C19 no incrementa la tolerancia en *O. sativa* expuesta a etofumesato y benfuresato, que son herbicidas ampliamente utilizados en la producción de esta planta (Kawahigashi *et al.* 2002). En este contexto, estudios posteriores deben ser encaminados en la búsqueda de genes del CYP450 que estimulen una tolerancia o resistencia a una amplia gama de herbicidas en plantas de interés agronómico.

CONCLUSIONES

El complejo enzimático del citocromo P450 involucra una amplia familia de genes con una diversidad de funciones clave en las plantas ya que participan en diversos procesos metabólicos de importancia para el óptimo desarrollo fisiológico (por ej. biosíntesis de giberelinas, fenilpropanoides, brasinoesteroides, etc.), así como en la biosíntesis *de novo* de metabolitos de importancia en los procesos de defensa y señalización

contra organismos patógenos como son las fitoalexinas y en procesos de biotransformación de herbicidas.

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

La inserción de genes del CYP450 de mamíferos en plantas de interés agronómico mediante técnicas de transformación genética tiene un papel relevante en la degradación de herbicidas ya que genera la posibilidad de usar los genes del CYP450 en la producción de plantas transgénicas con fines de fitorremediación o bien para incrementar la tolerancia a herbicidas.

REFERENCIAS

- Bate N. y 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. y Dennis E.S. (1999). A prolonged cold treatment-induced cytochrome P450 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 22, 791-800.
- Bolwell G.P., Bozak K. y Zimmerlin A. (1994). Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* 37, 1491-1506.
- Bozak K., Yu H., Sirevåg R. y Christoffersen R.E. (1999). Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 3904-3908.
- Chaban C., Waller F., Furuya M. y 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. *Annu. Rev. Plant. Biochem. Plant. Mol. Biol.* 49, 311-343.
- Clouse S.D. y Sasse J.M. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 427-451.
- Davidson E.S., Elliott R., Helliwell C., Poole A. y Reid J. (2003). The pea gene *NA* encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase1. *Plant Physiol.* 131, 335-344.
- Didierjean L., Gondet L., Perkins R., Lau S.C., Schaller H., O'Keefe D.P. y Werck-Reichhart D. (2002). Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from *Jerusalem artichoke*. *Plant Physiol.* 130, 179-189.
- Donaldson R.P. y 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. En: *Microbial and plant cytochromes P-450. Biochemical characteristics, genetic engineering and practical implications* (K. Ruckpaul y H. Rein, Eds.). Akademie-Verlag, Berlin, pp. 191-232.
- Forthoffer N., Helvig C., Dillon N., Benveniste I., Zimmerlin A., Tardif F. y Salaün J.P. (2001). Induction and inactivation of a cytochrome P450 conferring herbicide resistance in wheat seedlings. *EJCPA.* 26, 9-16.
- Froehlich J.E., Itoh A. y 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. y 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. y Peacock W.J. (2001). The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 2065-2070.
- Humphreys J.M. y Chapple C. (2004). Immunodetection and quantification of cytochromes P450 using epitope tagging: immunological, spectroscopic, and kinetic analysis of cinnamate 4-hydroxylase. *J. Immunol. Method.* 292, 97-107.
- Inui H., Shiota N., Ishige T., Ohkawa Y. y Ohkawa H. (1998). Herbicide metabolism and resistance of transgenic potato plants expressing rat cytochrome P4501A1. *Breeding Sci.* 48, 135-143.
- Inui H., Shiota N., Ido Y., Inoue T., Hirose S., Kawahigashi H., Ohkawa Y. y Ohkawa H. (2001). Herbicide metabolism and tolerance in the transgenic rice plants expressing human CYP2C9 and CYP2C19. *Pest. Biochem. Physiol.* 71, 156-169.
- Irmeler S., Schröder G., St-Pierre B., Crouch P., Hotze M., Schmidt J., Strack D., Matern U. y 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. y 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. y Ohkawa Y. (2003). Transgenic rice plants expressing human CYP1A1 exude herbicide metabolites from their roots. *Plant Sci.* 165, 373-381.
- Kawahigashi H.S., Hirose H., Inui H. y Ohkawa Y. (2005). Enhanced herbicide cross-tolerance in transgenic rice plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Plant Sci.* 168, 773-781.

- Koepe M.K., Hirata C.M., Brown H.M., Kenyon W.H., O'Keefe D.P., Lau S.C., Zimmerman W.T. y 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. y 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. y Cutler A.J. (1998). Absciscic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol.* 118, 849-860.
- Lamb D.C., Kelly D.E., Hanley S.Z., Mehmood Z. y 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.
- Luo P., Wang Y., Wang G., Essenberg M. y 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.
- Madyastha K.M., Ridway J.E., Dwyer J.G. y 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.
- Marcacci S., Raveton M., Ravanel P. y Schwitzguébel J. (2005). Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Environ. Exper. Bot.* En prensa.
- Morant M., Bak S., Lindberg M.B. y Werck-Reichhart D. (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 151-162.
- Mujer V. y Smigocki C. (2001). Cytokinin- and wound-inducible cytochrome P450 from *Nicotianaplungab-inifolia*. *Physiol. Plantarum.* 111, 172-178.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R. y Waxman D.J. (1996). Up date 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. y 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. y 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. y Lee Y.Ch. (2003). Expression of a ripening-related cytochrome P450 cDNA in Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams). *Gene.* 305, 133-140.
- Saito S., Hirai N., Matsumoto C., Ohigashi H., Ohta D., Sakata K. y Mizutani M. (2004). *Arabidopsis* CYP707as encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant. Physiol.* 134, 1439-1449.
- Siminszky B., Corbin F.T., Ward E.J., Fleischmann T.J. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y 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. y Didierjean L. (2000). Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, 116-123.
- Winkler R.G. y 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. y 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. y Ohkawa H. (2000). Molecular cloning of novel cytochrome P450 species induced by chemical treatments in tobacco cells. *Pest Biochem. Physiol.* 68, 11-25.