

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00379

# 烟草细胞色素 P450 的基因组学分析

解敏敏, 龚达平, 李凤霞, 刘贯山, 孙玉合

中国农业科学院烟草研究所, 中国农业科学院烟草遗传改良与生物技术重点开放实验室, 青岛 266101

**摘要:** 细胞色素 P450 是一类含血红素的单加氧酶超基因家族, 在植物多种代谢途径中起着重要作用。为了解烟草中的 P450 的种类和数量, 文章将植物代表性 P450 蛋白质序列与烟草基因组序列比对, 在烟草基因组中鉴定了 44 个 P450 家族共 263 个成员。将这些烟草 P450 基因与烟草表达序列标签(EST)比对, 发现 173 个成员有 EST 证据。通过与拟南芥中已知的 P450 蛋白序列比较, 分析了部分烟草 P450 蛋白序列的特征和二级结构。根据烟草基因芯片数据和部分基因的 RT-PCR 结果, 发现 73 个烟草 P450 基因能够在不同的生长发育时期表达, 其中部分基因具有组织特异性。这些研究结果为烟草 P450 基因功能的深入分析奠定了基础。

**关键词:** 烟草; 细胞色素 P450; 基因芯片; 表达序列标签(EST)

## Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the tobacco

XIE Min-Min, GONG Da-Ping, LI Feng-Xia, LIU Guan-Shan, SUN Yu-He

Key Laboratory of Tobacco Genetic Improvement and Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China

**Abstract:** Plant cytochrome P450 monooxygenases (CYP) constitute a large superfamily of heme-thiolate proteins, which are involved in a wide range of metabolic pathways. In this study, comparative genomic approaches were used to analyze tobacco CYP genes and their expression patterns. Based on analysis of the tobacco genomic DNA sequences that are currently available, 263 P450 genes that belong to 44 distinct clans were identified. EST evidence from 173 of the CYPs suggested that these genes are transcribed. Sequence features and secondary structures of the tobacco P450 genes were further analyzed through comparison with known P450 proteins. The expression profiles of 73 P450 genes were subsequently investigated by analyses of tobacco microarray data and RT-PCR. The results showed a variety of expression patterns of these genes in different tissues with a number of genes expressed in a tissue-specific manner. This study has set a foundation for further studies on functions of P450 genes in tobacco.

**Keywords:** tobacco; cytochrome P450 monooxygenase; gene microarray; EST

收稿日期: 2012-08-31; 修回日期: 2012-11-06

基金项目: 中国烟草总公司烟草基因组计划重大专项项目“烟草突变体筛选与鉴定”(编号: 110201201004(JY-04)和中央公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: 0032012028)资助

作者简介: 解敏敏, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 烟草基因组学。E-mail: xieminmin\_2004@163.com

通讯作者: 孙玉合, 博士, 研究员, 研究方向: 烟草基因组学。E-mail: yhsun@163.com

网络出版时间: 2013-1-15 17:27:01

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130115.1727.002.html>

细胞色素P450 单加氧酶(P450s)是一个保守的血红素硫蛋白基因超家族,在多种多样的基质代谢中起着很重要的作用,包括内源性和外源性化合物的代谢。P450s广泛存在于各种动物、植物、真菌和细菌中<sup>[1]</sup>。1969年Frear<sup>[2]</sup>首次在棉花(*Gossypium hirsutum* L.)发现P450s,随后在其他多种植物中均发现P450s的存在,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)<sup>[3]</sup>、小麦(*Triticum aestivum* L.)<sup>[4]</sup>、苜蓿(*Medicago sativa* L.)<sup>[5]</sup>、蓖麻(*Ricinus communis* L.)<sup>[6]</sup>等。P450酶系可能是自然界中最具催化作用的生物催化剂,它所催化的反应类型广泛而复杂,催化的底物范围极广。根据其功能,植物P450s大体可以分为两类,一种是参与植物次生物质的合成,如植物激素、萜类、木质素中间物、甾醇等;另一种是具有代谢解毒功能的P450,如催化环境毒素、农药、有机染料等变成非毒性物质<sup>[7,8]</sup>;还有一些P450可能催化某些无毒性物质成为毒性物质,如除草剂前体<sup>[9]</sup>。

随着越来越多的植物基因组测序完成,更多的植物P450序列被鉴定<sup>[10,11]</sup>。基于蛋白序列的相似性和亲缘关系,P450归类为家族和亚家族。同一家族的成员序列相似性>40%,序列相似性>55%归类为一个亚家族<sup>[1]</sup>。随着P450家族成员的增多,部分低于40%的蛋白序列遗传聚类分析中明显聚在一起,它们也被归为同一家族。植物P450超家族归类为10个集团和127个家族,同一亚家族的基因往往具有类似的功能<sup>[12]</sup>。

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)属茄科植物,是重要的经济作物之一。同时烟草较早应用于分子生物学和基因工程研究,还是典型的模式作物。与在拟南芥中鉴定的46个家族和水稻(*Oryza sativa* L.)中47个家族相比<sup>[13]</sup>,烟草中仅有少数P450基因被报道。Wang等<sup>[14]</sup>鉴定了一个烟草腺毛特异的P450基因,通过反义和正义共抑制方法研究表明,P450可以将腺毛分泌成分西柏三烯一醇转化为西柏三烯二醇,转化烟草植株对蚜虫的抗性有明显的提高。烟草中的烟碱(尼古丁)转化为降烟碱是由CYP82E4介导的<sup>[15]</sup>。在本生烟草(*Nicotiana benthamiana* L.)中还鉴定了参与甾醇合成的CYP51家族基因等<sup>[16]</sup>。普通烟草为异源四倍体植物,基因组大小约4.5G。美国烟草基因组计划对四倍体栽培烤烟品种(*N. tabacum* v. *Hicks-Broadleaf*)采用甲基化过滤法对基因组中基

因富集区进行测序组装,共获得35 060个基因标签<sup>[17]</sup>。此外,NCBI还登录了超过34万条普通烟草EST数据。Edwards等<sup>[18]</sup>基于EST数据设计并定制了Affymetrix公司的烟草基因芯片,对19个不同组织样品进行了基因表达检测。本研究基于烟草基因组、EST数据和芯片数据,利用生物信息学手段,对烟草中的P450基因家族进行分析,以期揭示P450基因的功能并改良烟草的品质奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 烟草P450基因的鉴定

从NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载普通烟草的基因组数据以及EST数据。从NCBI和P450数据库(<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>)下载其他植物如拟南芥、水稻、番茄等已报道的P450基因数据。根据植物P450基因的分类原则,每个亚家族选择代表性的P450蛋白质序列与烟草基因组数据进行TBLASTN比对<sup>[19]</sup>。得到的P450基因组区域采用基因预测软件Fgenesh预测可能的烟草P450s基因<sup>[20]</sup>。同时,为证实这些预测基因的真实性,将预测的基因序列与EST数据库进行严格的BLASTN比对( $e$ 值: $\leq 1e^{-15}$ ),进一步寻找EST证据。参照国际上关于P450命名的权威数据对烟草中的P450基因进行命名。

### 1.2 多序列比对及二级结构元件分析

对预测的P450蛋白序列每个家族选择代表性成员使用ClustalX(1.83)软件进行多序列比对。将已知的拟南芥AtAOS(CYP74)序列结构作为基础,与预测的烟草P450代表性序列进行多序列比对。并以AtAOS的二级结构作为模板标明二级结构元件<sup>[21-23]</sup>。

### 1.3 烟草P450基因表达谱分析

基于烟草EST和基因芯片数据<sup>[18]</sup>(<http://sol-genomics.net/>)来分析烟草P450基因的表达情况。利用Cluster 3.0对组织和基因进行层次聚类分析,Treeview软件对数据结果进行可视化<sup>[24]</sup>。使用原平皓RNA快速提取试剂盒按照说明提取普通烟草红花大金元幼苗期根、茎、叶和成熟期的根、茎、叶、花组织的RNA。并使用TaKaRa反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,进行RT-PCR分析。PCR反应条件

为 :94 预变性 4 min; 94 变性 30 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 45 s, 共 25 个循环; 最后再 72 延伸 10 min, 4 保存。反应结束后, 取 2  $\mu$ L PCR产物用于 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草基因组 P450 的鉴定

通过将植物代表性的P450 蛋白序列与普通烟草基因组比对和预测, 鉴定了 263 个可能的烟草P450 基因, 归属于 44 个基因家族, 其中 173 个基因已经找到EST证据。表 1 列出了每个基因家族中可能的 P450 基因数目, 以及对应的有EST证据的P450 基因数目。例如, CYP51 家族在烟草中有 2 个家族成员, 均有EST证据, 在拟南芥中也是 2 个成员<sup>[25]</sup>。CYP51 家族是唯一一个在植物、动物、真菌和细菌等多个物种中都具有同源基因的P450 家族, CYP51 家族功能较保守, 催化有关甾醇类及其衍生物的生物合成

<sup>[26, 27]</sup>。CYP71 家族在烟草中鉴定到 38 个可能的家族成员, 比在拟南芥中的数量多 1 个<sup>[25]</sup>, 并有 19 个序列找到EST证据。CYP86 家族在烟草中存在 6 个可能的成员, 都找到了EST证据, 家族成员数量上比拟南芥中的少 1 个<sup>[25]</sup>, 该家族成员在功能上参与脂肪酸的代谢<sup>[28]</sup>。CYP85 家族在烟草中有 2 个可能的成员, 仅有一条找到了EST证据, 其在拟南芥中仅有 1 个家族成员<sup>[25]</sup>, 参与植物萜类等化合物的合成<sup>[29]</sup>。

### 2.2 P450 序列的功能结构域分析

所有已知的P450s似乎呈现相似的折叠结构, 然而其中常常出现低于 20%的序列相似性并且有很多不同的底物<sup>[30]</sup>。在烟草的P450s序列比对中, 蛋白序列的平均长度约为 500 个氨基酸残基, 不同家族间的基因有着不同程度的序列保守性。目前, 微生物和动物中报道了 20 多个P450 基因的蛋白结构, 但在植物中只有拟南芥AOS(CYP74A)和灰白银胶菊

表 1 263 个可能的烟草 P450s 与相应的 EST 证据

家族名称	可能的 P450 数目	EST 序列数目	家族名称	可能的 P450 数目	EST 序列数目
CYP51	2	2	CYP94	17	12
CYP71	38	19	CYP96	13	6
CYP72	9	8	CYP97	2	2
CYP73	4	4	CYP98	5	4
CYP74	7	7	CYP704	4	4
CYP75	2	2	CYP706	4	2
CYP76	22	13	CYP707	3	3
CYP77	6	6	CYP710	2	2
CYP78	12	9	CYP712	1	0
CYP79	4	1	CYP714	4	4
CYP80	2	1	CYP715	3	0
CYP81	9	7	CYP716	8	4
CYP82	14	9	CYP718	2	0
CYP84	3	2	CYP720	2	1
CYP85	2	1	CYP721	1	1
CYP86	6	6	CYP722	2	1
CYP87	3	0	CYP724	5	1
CYP88	2	1	CYP728	3	3
CYP89	8	7	CYP734	3	3
CYP90	6	5	CYP735	2	0
CYP92	5	5	CYP736	7	3
CYP93	2	1	CYP749	2	1
总计	168	116	总计	95	57

(*Parthenium argentatum* L.)的AOS(*CYP74A2*)解析了蛋白结构<sup>[21,22]</sup>。为了更好的理解P450 酶类的结构和功能,我们将已知结构的拟南芥*AtAOS(CYP74)*序列与烟草P450 代表性序列进行多序列比对,根据拟南芥*AtAOS*序列的结构作为模板,来预测烟草P450 序列的二级结构区域(图 1)。

图 1 显示所有烟草P450 序列含有典型的P450 保守结构域,包括C-末端的血红素结合区域(F××G×××C×G),这一高度保守的基元常被用作鉴定P450 蛋白的主要特征<sup>[21,31]</sup>;PERF结构域(P×R×)和K螺旋(E××R),有研究表明这些基序在P450 蛋白折叠中起至关重要的作用<sup>[32]</sup>。多序列比对显示烟草P450 序列间某些氨基酸残基具有严格的一致性,这些保守残基普遍分布在P450 序列的 5 个区域,包括 $\alpha 3$  螺旋、 $\alpha 3$  末端 $\alpha 5$  螺旋的一部分、 $\alpha 10$  螺旋、 $\alpha 11$  螺旋、 $\alpha 14$  螺旋和 $\alpha 17$  螺旋之间的血红素结合环<sup>[5]</sup>。与膜结合的P450 序列N端有一段疏水区域作为跨膜信号,紧邻此区有一段保守的富含脯氨酸(Pro)的区域,在所有真核生物中具有同源性<sup>[31]</sup>。6 个底物识别位点(Substrate recognition sites, SRSs)(图 1 中黑框标注)参与接触配体,其中很多位于变化的二级结构元件区,这些可变的区域说明可能存在底物特异性。尽管SRSs的发现有助于我们对P450 结构和功能的理解,然而多个P450 晶体结构的序列比对和突变分析表明,并不是所有P450 的SRSs都起作用,其他P450 家族基因也可能存在相同的情况<sup>[33]</sup>。

### 2.3 烟草 P450s 家族基因表达分析

通过前面的EST比对,可以初步了解P450 相关基因的表达丰度,比如*CYP51*、*CYP71*、*CYP73*、*CYP89*、*CYP98* 等家族基因的ESTs被发现多次。进一步使用烟草的基因芯片表达数据进行了表达特征分析<sup>[18]</sup>。在TobEA基因芯片中,共有 73 个P450 基因设计了探针。对从种子萌发到叶片衰老不同时期的 19 个组织的P450 表达数据聚类分析显示,烟草P450 基因的表达谱模式大致形成了 4 个不同的类群(图 2)。第一个类群中的P450 基因各组织中整体表达水平较低,而在根中表达量相对较高。其中*CYP707A1*、*CYP77A3* 例外,它们在根中表达量很低。第二类基因在所有组织中表达水平均较低,可能与抗性相关,要在外界环境(如病虫害等)的诱导

下才表达。第三类基因在各个组织中均有较高水平的表达。其中,部分P450 基因在整个生命周期中持续高水平的表达,例如*CYP73A1*、*CYP73A2*、*CYP51G1*、*CYP98A1*、*CYP82E2*、*CYP71D2*、*CYP75B1*、*CYP90A2*、*CYP97B1*,这些基因很有可能参与组成型的内源生理代谢过程<sup>[34]</sup>;而*CYP71D3*、*CYP76B2*、*CYP77A1*、*CYP77A2*、*CYP71A1*、*CYP72A1*、*CYP96A2* 则在根和种子中表达量很低或不表达。第四类基因的表达具有组织特异性,如*CYP72A1* 在早期、成熟及衰老叶片中持续高表达,有研究表明<sup>[35]</sup>*CYP72* 是在叶中特异表达的;*CYP74C2*、*CYP86A1*、*CYP96A1* 在根中检测到相对高水平的表达,Ehlting等<sup>[36]</sup>研究结果显示拟南芥*CYP86A1* 也在根中特异高表达;*CYP74C1* 在下部茎和根中相对高表达;*CYP96A4* 在种子中检测到较高表达。因此,进一步深入的研究不同P450 家族基因的表达水平和时期特异性细胞过程之间的关系是非常有必要的。

为了验证基因芯片数据分析的可靠性,本研究从每个类型中选取典型的 P450 基因进行了半定量 RT-PCR 验证。对 5 个 P450 基因(*CYP51G1*、*CYP77A1*、*CYP74C2*、*CYP89A4*、*CYP714G1*)在苗期根、茎、叶和成熟期根、茎、叶、花 7 个组织中的检测结果表明同基因芯片数据分析的结果基本一致。

## 3 讨论

烟草是植物界中具有重要地位的模式植物,本文通过现有的基因组数据和 EST 数据,对烟草超基因家族 P450s 进行了初步分析,共鉴定发现 44 个 P450 家族 263 个基因,其中为 173 个基因找到了 EST 证据。通过序列比对分析了部分 P450 基因的二级结构元件,并基于 EST 和芯片数据通过生物信息学工具分析 P450 基因的表达模式,烟草芯片数据库提供了不同组织中 P450 基因的表达信息,这为今后 P450 基因进一步的功能分析打下了基础。

P450 家族构成了植物基因组中最大的酶家族,充分说明了其在信号传递、防御反应以及代谢产物合成等方面的重要性。目前,植物的P450 超家族共分为 127 个家族。相比脊椎动物(19 个家族)和昆虫(67 个家族)要多,但比真菌(399 个家族)和细菌(333 个家族)少<sup>[12]</sup>。植物中许多新的基因家族随着越来越多的植物基因组测序完成而增加。最近,同属于茄



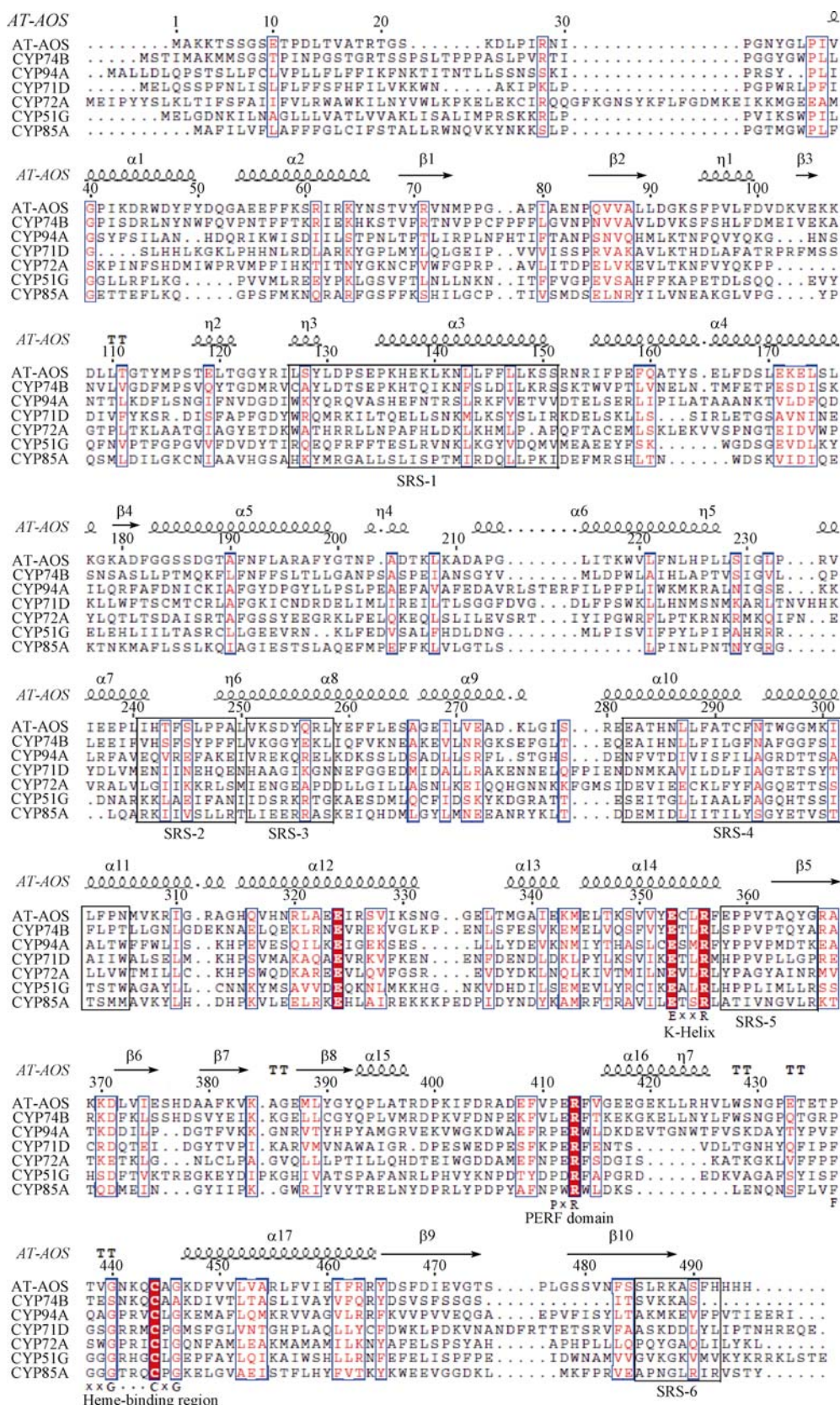


图 1 烟草代表性 P450s 和 AtAOS 的多序列比对  
第一行基于 AtAOS 的结构标注二级结构元件; 红色覆盖区表示严格一致性的序列; 黑框表示预测的 SRSs 区域。

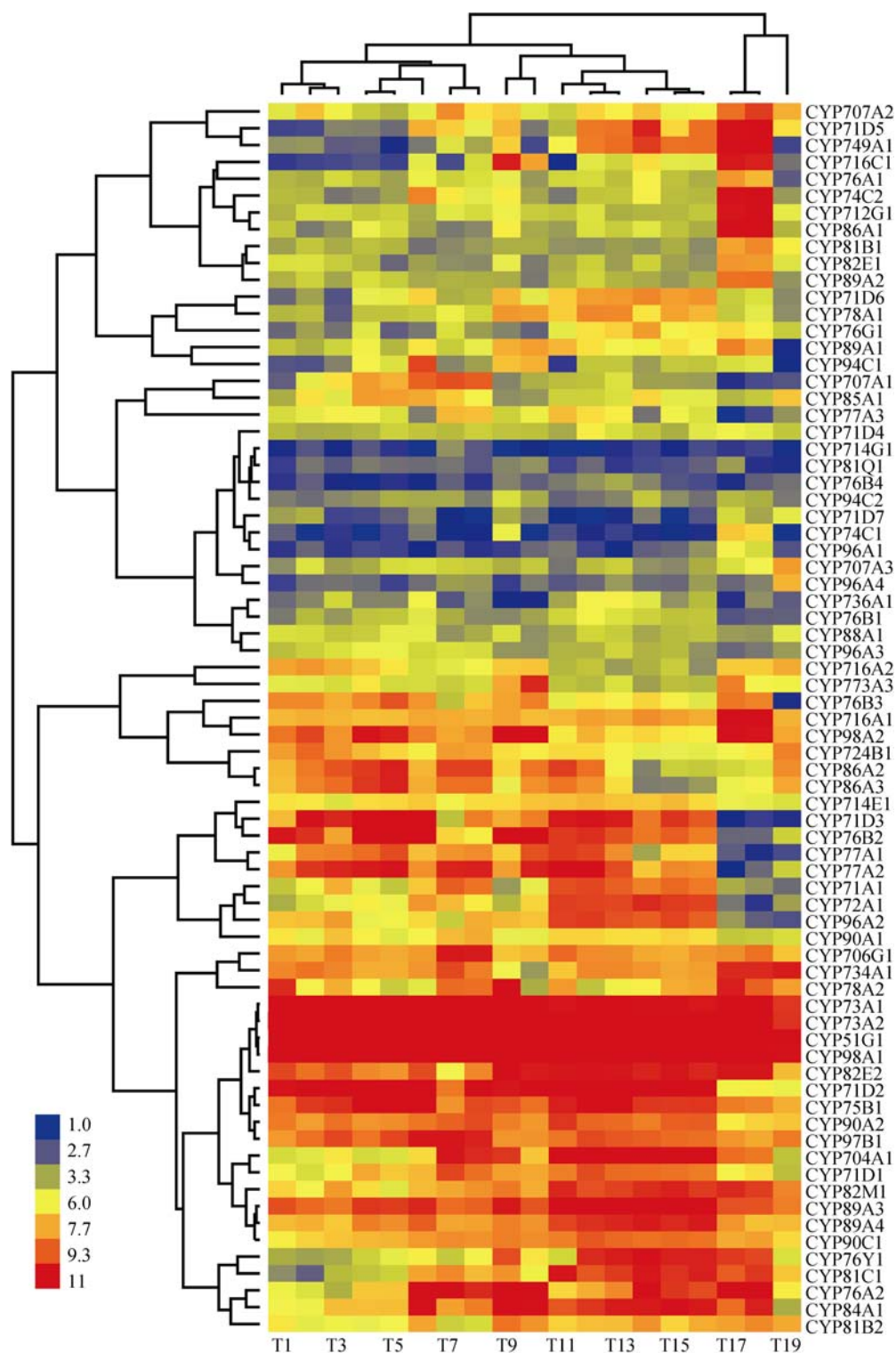


图 2 烟草 P450 基因表达模式的聚类分析图

T1: 植物茎尖; T2: 花的茎尖; T3: 幼叶; T4: 含苞的花蕾; T5: 开放的花蕾; T6: 花; T7: 子叶; T8: 幼芽; T9: 下部茎; T10: 上部茎; T11: 茎生叶; T12: 早期衰老叶; T13: 中/早期衰老叶; T14: 后期衰老叶; T15: 成熟叶片; T16: 中/后期衰老叶片; T17: 成熟根; T18: 幼根; T19: 种子。颜色标尺代表的是基因表达水平, 从蓝色到红色代表基因表达水平从低到高。



科的番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)基因组测序完成后,并没有发现新的基因家族,说明植物基因组中P450 基因家族已经趋于饱和<sup>[37]</sup>。目前本文所鉴定的基因家族中还没有发现新的基因家族。与番茄相比,烟草中的很多基因在番茄中没有找到直系同源基因,说明P450 家族在茄科植物中可能发生了一定程度的分化。所有已报道的基因组P450 家族的研究发现,P450 已经分化出很多物种特异的家族<sup>[12]</sup>。本研究所鉴定的烟草P450 的基因数量与拟南芥相当,但明显少于番茄基因组(457 个P450 基因)<sup>[12,37]</sup>。由于目前烟草基因组是通过基因富集区测序得到的,基因组组装的序列过短,因此可能忽略了很多过短的真正P450 基因。同时普通烟草是异源四倍体,一个基因包含两个拷贝,通过序列比对分析也证实了这一点。因此,烟草基因组中所有的P450 基因成员还有待于进一步的鉴定。

植物P450 在苯丙烷类、生物碱、萜类、生氰糖苷类、激素等的生物合成途径中起着重要作用<sup>[28]</sup>。在苯丙烷代谢途径中,CYP71、CYP73、CYP75、CYP81、CYP84、CYP93、CYP98 等家族在木质素中间物、黄酮、类黄酮、呋喃香豆素的合成中发挥重要作用,主要参与脂肪族、芳香族碳的羟基化反应以及芳基转移反应、亚甲基二氧桥的生成等<sup>[38]</sup>。其中,肉桂酸-4-羧化酶(ChC)是第一个被鉴定的CYP450(CYP73)<sup>[39]</sup>。CYP74、CYP78、CYP81、CYP86、CYP94、CYP703、CYP709、CYP711、CYP719、CYP726 等家族参与脂肪酸的羟基化、环氧化以及不饱和脂肪酸的过氧化氢功能基团的裂解<sup>[40]</sup>。CYP51、CYP71、CYP88、CYP97、CYP701、CYP705、CYP706、CYP707、CYP714、CYP720、CYP725、CYP735 等家族参与许多萜类化合物的生物合成,如赤霉素、脱落酸、类胡萝卜素及植物防御物质等。赤霉素(GA)的生物合成途径中,内-贝壳杉烯→内-贝壳杉醇→内-贝壳杉醛→内-贝壳杉酸→内-7 $\alpha$ -羟基贝壳杉烯酸等后3个连续步骤都是由CYP88A催化的<sup>[41]</sup>。在生物碱合成代谢中P450 催化底物的羟基化、氧化聚合(CYP80A1)、氧化开环(CYP72A1)反应。烟草中,CYP82E4 催化烟碱转化为降烟碱<sup>[15]</sup>。植物自我保护的硫代葡萄糖苷类化合物主要有CYP79 和CYP83 两个家族参与<sup>[42]</sup>。CYP72、CYP85、CYP90、CYP92、CYP710、CYP724、CYP734 等在植物油菜素类固醇

激素的合成与钝化中发挥重要作用,主要参与C-2、C-3、C-6、C-22 和C-23 位的羟基化与氧化反应<sup>[43]</sup>。P450(CYP71)催化植物羟肟酸的合成,在植物的病原菌和昆虫抗性中起重要作用<sup>[40]</sup>。这些植物P450 蛋白功能的明确,为烟草P450 的具体功能研究提供了重要线索。

基因的时空表达模式是研究基因功能的重要方面,具有相似表达模式的基因可能具有共同的功能,或者被相同的基因所调控,或者是具有共同的起源<sup>[44,45]</sup>。高通量的基因芯片技术为在基因组范围内研究不同基因的表达模式提供了平台。从烟草P450 基因的表达数据聚类分析可以看出大多数同一家族的基因表现出相似的表达模式,它们可能依次催化同一生化途径中的相似底物。在拟南芥中,2 个CYP85 基因和4 个CYP90 基因共同参与油菜素甾醇的合成反应<sup>[46-49]</sup>。也有很多完全不同的家族表现出相同的表达模式,它们也可能催化相似的生化途径,最典型的例子是罂粟(*Papaver somniferum* L.)和人的神经母细胞瘤中吗啡的合成由多个毫不相关的P450 基因家族催化<sup>[50]</sup>。Ehltling等<sup>[36]</sup>利用拟南芥基因芯片数据分析了227 个P450 基因在正常组织、胁迫处理、激素处理和突变体的277 个样品中的表达情况。只有7 个基因在任何组织中都没有表达,18 个基因在80%的组织中都表达,接近一半的基因表现出组织特异性。通过共表达基因分析鉴定了与光能合成、苯丙烷类、三萜、茉莉酸类化合物代谢的途径。本文中烟草基因芯片表达数据所提供的信息相对有限,需要进一步研究P450 基因在微生物侵染、光、化学物质等诱导下的表达和调控及其参与的相关代谢途径。

在烟草中,苯丙烷类和萜类代谢是烟草香气物质形成的重要途径,生物碱的合成是烟草有害物质代谢的重要途径。因此,烟草P450 的研究对于提高烟草品质和降低烟草危害有着重要的意义。此外,细胞色素P450 在增强植物抗性、降解农药残留、生产药用化合物等方面也具有广阔的应用前景<sup>[51]</sup>。

## 参考文献(References):

- [1] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping,

- accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(1): 1–42. [DOI](#)
- [2] Frear DS, Swanson HR, Tanaka FS. N-Demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochemistry*, 1969, 8(11): 2157–2169. [DOI](#)
- [3] Paquette SM, Bak S, Feyereisen R. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol*, 2000, 19(5): 307–317. [DOI](#)
- [4] Murphy PJ, West CA. The role of mixed function oxidases in kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* Greene endosperm. *Arch Biochem Biophys*, 1969, 133(2): 395–407. [DOI](#)
- [5] Li LY, Cheng H, Gai JY, Yu DY. Genome-wide identification and characterization of putative cytochrome P450 genes in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 2007, 226(1): 109–123. [DOI](#)
- [6] Lew FL, West CA. (-)-kaur-16-en-7 $\beta$ -ol-19-oic acid, an intermediate in gibberellin biosynthesis. *Phytochemistry*, 1971, 10(9): 2065–2076. [DOI](#)
- [7] Robert PD, Douglas GL. Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol*, 1991, 96(3): 669–674. [DOI](#)
- [8] Werck-Reichhart D. Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism. *Drug Metabol Drug Interact*, 1995, 12(3–4): 221–243. [DOI](#)
- [9] Schuler MA. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol*, 1996, 112(4): 1411–1419. [DOI](#)
- [10] 王新宇, 王崇英, Olsson O. 杨树细胞色素P450类固醇单加氧酶(CYP90)基因的克隆与分析. *遗传学报*, 2005, 32(4): 384–392. [DOI](#)
- [11] 阮仁余, 孔建强, 郑晓东, 张书香, 秦咸蕴, 程克棣, 王健明, 王伟. 中国红豆杉细胞色素P450还原酶的基因克隆、表达与活性分析. *遗传*, 2010, 32(11): 1187–1194. [DOI](#)
- [12] Nelson DR, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J*, 2011, 66(1): 194–211. [DOI](#)
- [13] Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S. Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol*, 2004, 135(2): 756–772. [DOI](#)
- [14] Wang E, Wang R, DeParasis J, Loughrin JH, Gan S, Wagner GJ. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(4): 371–374. [DOI](#)
- [15] Siminszky B, Gavilano L, Bowen SW, Dewey RE. Conversion of nicotine to normicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(41): 14919–14924. [DOI](#)
- [16] Burger C, Rondet S, Benveniste P, Schaller H. Virus-induced silencing of sterol biosynthetic genes: identification of a *Nicotiana tabacum* L. obtusifolius-14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) by genetic manipulation of the sterol biosynthetic pathway in *Nicotiana benthamiana* L. *J Exp Bot*, 2003, 54(388): 1675–1683. [DOI](#)
- [17] Gadani F, Hayes A, Opperman CH, Lommel SA, Sosinski BR, Burke M, Hi L, Brierly R, Salstead A, Heer J, Fuelner G, La-key N. Large scale genome sequencing and analysis of *Nicotiana tabacum*: the tobacco genome initiative. In: Proceedings, 5èmes Journées Scientifiques du Tabac de Bergerac-5th Bergerac Tobacco Scientific Meeting, Bergerac, France, 2003: 117–130. [DOI](#)
- [18] Edwards KD, Bombarely A, Story GW, Allen F, Mueller LA, Coates SA, Jones L. TobEA: an atlas of tobacco gene expression from seed to senescence. *BMC Genomics*, 2010, 11: 142, doi: 10.1186/1471-2164-11-142. [DOI](#)
- [19] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang JG, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389–3402. [DOI](#)
- [20] Salamov AA, Solovyev VV. Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res*, 2000, 10(4): 516–522. [DOI](#)
- [21] Lee DS, Nioche P, Hamberg M, Raman CS. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature*, 2008, 455(7211): 363–368. [DOI](#)
- [22] Li LN, Chang Z Z, Pan Z, Fu ZQ, Wang XQ. Modes of heme binding and substrate access for cytochrome P450 CYP74A revealed by crystal structures of allene oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 13883–13888. [DOI](#)
- [23] Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasemann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science*, 1993, 261(5122): 731–736. [DOI](#)
- [24] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14863–14868. [DOI](#)
- [25] Xu W, Bak S, Decker A, Paquette SM, Feyereisen R, Galbraith DW. Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 2001, 272(1–2): 61–74. [DOI](#)
- [26] Yoshida Y, Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O. Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450



- gene superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(3): 799–804. [DOI](#)
- [27] Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(3): 467–477. [DOI](#)
- [28] Wellesen K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A. Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid  $\omega$ -hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17): 9694–9699. [DOI](#)
- [29] Hamberger B, Bohlmann J. Cytochrome P450 mono-oxygenases in conifer genomes: discovery of members of the terpenoid oxygenase superfamily in spruce and pine. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 6): 1209–1214. [DOI](#)
- [30] Graham SE, Peterson JA. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys*, 1999, 369(1): 24–29. [DOI](#)
- [31] Schuler MA. Plant Cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci*, 1996, 15(3): 235–284. [DOI](#)
- [32] Chen S, Zhou D. Functional domains of aromatase cytochrome P450 inferred from comparative analyses of amino acid sequences and substantiated by site-directed mutagenesis experiments. *J Biol Chem*, 1992, 267(31): 22587–22594. [DOI](#)
- [33] Podust LM, Stojan J, Poulos TL, Waterman MR. Substrate recognition sites in 14 $\alpha$ -sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51. *J Inorg Biochem*, 2001, 87(4): 227–235. [DOI](#)
- [34] Fu CJ, Xiong J, Miao W. Genome-wide identification and characterization of cytochrome P450 monooxygenase genes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *BMC Genomics*, 2009, 10: 208, doi: 10.1186/1471-2164-10-208. [DOI](#)
- [35] Bolwell GP, Bozak K, Zimmerlin A. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1491–1506. [DOI](#)
- [36] Ehlting J, Sauveplane V, Olry A, Ginglinger JF, Provart NJ, Werck-Reichhart D. An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 47, doi: 10.1186/1471-2229-8-47. [DOI](#)
- [37] The Tomato Genome Consortium. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 2012, 485(7400): 635–641. [DOI](#)
- [38] 贺丽虹, 赵淑娟, 胡之璧. 植物细胞色素P450 基因与功能研究进展. *药物生物技术*, 2008, 15(2): 142–147. [DOI](#)
- [39] Russell DW. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. *J Biol Chem*, 1971, 246(12): 3870–3878. [DOI](#)
- [40] Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49(1): 311–343. [DOI](#)
- [41] Davidson SE, Reid JB, Helliwell CA. Cytochromes P450 in gibberellin biosynthesis. *Phytochem Rev*, 2006, 5(2-3): 405–419. [DOI](#)
- [42] Kutchan TM, Schröder J. Selected cell cultures and induction methods for cloning and assaying cytochromes P450 in alkaloid pathways. *Methods Enzymol*, 2002, 357: 370–381. [DOI](#)
- [43] Nafisi M, Sønderby IE, Hansen BG, Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Nørholm MH, Jensen NB, Li J, Halkier BA. Cytochromes P450 in the biosynthesis of glucosinolates and indole alkaloids. *Phytochem Rev*, 2006, 5(2-3): 331–346. [DOI](#)
- [44] Oakley TH, Østman B, Wilson ACV. Repression and loss of gene expression outpaces activation and gain in recently duplicated fly genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(31): 11637–11641. [DOI](#)
- [45] Gu X. Statistical framework for phylogenomic analysis of gene family expression profiles. *Genetics*, 2004, 167(1): 531–542. [DOI](#)
- [46] Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S. Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 770–779. [DOI](#)
- [47] Kim GT, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H. CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2005, 41(5): 710–721. [DOI](#)
- [48] Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA. The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 231–243. [DOI](#)
- [49] Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 1996, 85(2): 171–182. [DOI](#)
- [50] Boettcher C, Fellermeier M, Boettcher C, Dräger B, Zenk MH. How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(24): 8495–8500. [DOI](#)
- [51] 杨致荣, 毛雪, 杨致芬, 李润植. 细胞色素P450 基因及其在植物改良中的应用. *遗传*, 2003, 25(2): 237–240. [DOI](#)