ROLA CHITYNAZ W ROZWOJU ROŚLIN

THE ROLE OF CHITINASES IN THE PLANT DEVELOPMENT

Anna KISIEL, Katarzyna JĘCKOWSKA, Ewa KĘPCZYŃSKA

Katedra Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Streszczenie: Chitynazy, białka enzymatyczne hydrolizujące chitynę, są bardzo szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Sekwencje kodujące chitynazy posiadają wirusy, a także niemal wszystkie organizmy żywe poczynając od jednokomórkowych bakterii poprzez grzyby, rośliny niższe i wyższe, a skończywszy na zwierzętach i człowieku. Enzymy te posiadają bardzo zróżnicowaną strukturę i pełnią wielorakie funkcje. Chitynazy roślinne odkryte zostały jako czynniki grzybobójcze i długo ich działanie rozważane było w tym kontekście. Stąd też ich rola w innych procesach jest mniej poznana. W tej pracy opisano mechanizm działania tych białek, ich klasyfikację oraz znaczenie w rozwoju roślin.

Słowa kluczowe: chitynaza, embriogeneza, rozwój wegetatywny i generatywny, chityna, białka arabinogalaktanowe

Summary: Chitinase, a chitin hydrolyzing enzymatic proteins are widely distributed in nature. Chitinase coding sequences have viruses, and almost all living organisms ranging from unicellular bacteria by fungi, lower and higher plants, up to animals and human beings. These enzymes have a very diverse structure and perform multiple functions. Plant chitinases have been discovered as agents for their fungicidal activity and have long time been considered in this context. Therefore, their role in other processes is less understood. This paper describes the mechanism of action of these proteins, their classification and importance in the development of plants.

Key words: chitinase, embryogenesis, vegetative and generative growth, chitin, arabinogalactan-proteins

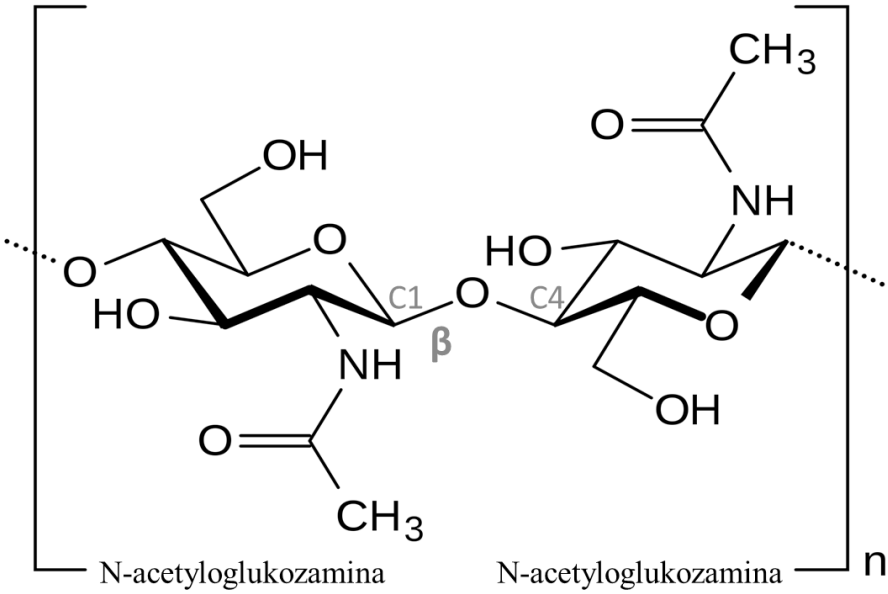
WSTĘP

Chitynazy, są szeroko rozpowszechnionymi białkami enzymatycznymi z grupy hydrolaz, których sekwencje kodujące znaleziono w wirusach, bakteriach, grzybach, owadach, zwierzętach i roślinach. Enzymy te, podobnie jak β-N-acetyloheksozoaminidazy, zaliczane są, do enzymów chitynolitycznych, należących do

większej grupy enzymatycznej – hydrolaz glikozydowych (GH). Do hydrolaz glikozydowych należą wszystkie enzymy hydrolizujące wiązania glikozydowe w polisacharydach, oligosacharydach i glikozydach. Jest to bardzo liczna grupa i w oparciu o sekwencje aminokwasowe ich domen katalitycznych podzielono je na ponad 110 rodzin. Chitynazy przyporządkowano do rodziny 18, 19, 23 i 48 hydrolaz glikozydowych, natomiast β-N-acetyloheksozoaminidazy do rodziny 3, 18, 20 i 84 [2].

Chitynazy uczestniczą w hydrolizie chityny, nierozpuszczalnego polimeru β-1,4-N-acetyloglukozaminy (GlcNAc), jednego z najczęściej występujących w przyrodzie polisacharydów (ryc. 1).

Chityna swoją strukturą zbliżona jest do celulozy, głównie ze względu na fakt tworzenia długich łańcuchów polimerowych N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniami β-1,4-glikozydowymi. Ponadto sieć przestrzenna (ang. *three dimensional,* 3D) mikrofibryli chityny jest kowalencyjnie przyłączona do β-1,3-glukanu, który jest drugim polisacharydem budulcowym występującym w większości ścian komórkowych grzybów [29]. W przyrodzie chityna występuje w dwóch formach krystalicznych, tj. α, której łańcuchy GlcNAc ułożone są antyrównolegle i β, której łańcuchy GlcNAc ułożone są równolegle [1]. Chityna jest składnikiem szkieletów owadów i skorupiaków oraz ich jaj, a także muszli mięczaków i ścian komórkowych grzybów [41, 65].



RYCINA 1. Struktura chemiczna łańcucha chityny. B – oznaczenie wiązania 1,4-glikozydowego pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich cząsteczek N-acetyloglukozaminy

FIGURE 1. The chemical structure of chitin chain. B – designation 1,4-glycosidic bond between the carbon C1 and C4 of two adjacent N-acetylglucosamine molecules

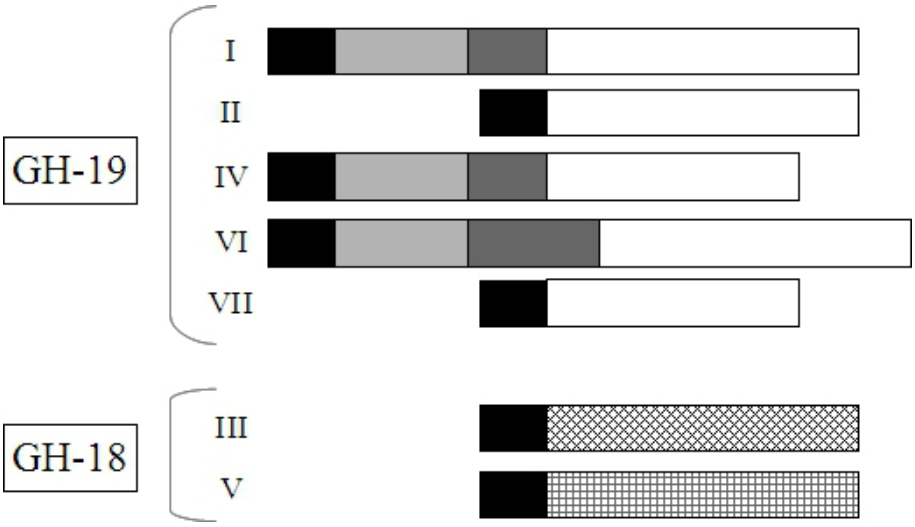
MECHANIZM DZIAŁANIA CHITYNAZ, ICH KLASYFIKACJA I WYSTĘPOWANIE

Chitynaza katalizuje hydrolizę wiązań pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich N-acetyloglukozamin w łańcuchu chityny. Ze względu na mechanizm działania wyodrębniono dwa rodzaje chitynaz: endochitynazy (EC 3.2.1.14) i egzochitynazy (EC 3.2.1.52) [60]. Endochitynazy nazywane są też chitynazami typu roślinnego („*plant type*"), natomiast egzochitynazy chitynazami typu bakteryjnego („*bacterial type*"). Endochitynazy rozszczepiają wiązania β-1,4-glikozydowe losowo w punktach wewnętrznych w polimerze, uwalniając rozpuszczalne multimery o małej masie cząsteczkowej, takie jak chitotetroza i chitotrioza oraz dimer diacetylchitobioza. Z kolei egzochitynaza hydrolizuje chitynę na dimery uwalniając diacetylochitobiozę, bez mono- lub oligosacharydów [3].

Jak już wspomniano wiele organizmów ma zdolność do wytwarzania enzymów chitynolitycznych rozkładających chitynę. Bakterie wytwarzają chitynazy należące głównie do rodziny GH-18, a ponadto do GH-19 i GH-23 [33]. Z kolei wszystkie chitynazy grzybowe [22], podobnie jak chitynazy wytwarzane przez owady zaliczane są do rodziny GH-18 [92]. Co więcej, sekwencje kodujące chitynazy z rodziny GH-18 są szeroko rozpowszechnione u wirusów oraz u zwierząt i roślin wyższych, natomiast chitynazy z rodziny GH-19 są głównie reprezentowane w roślinach wyższych i jak już wspomniano bakteriach. Te dwie rodziny różnią się sekwencją aminokwasową, strukturą trójwymiarową (3D), oraz mechanizmem molekularnym reakcji katalitycznych, a zatem uważa się, że mają różne ewolucyjne pochodzenie [44, 87]. Biorąc pod uwagę stechiomertię substratów i produktów reakcji enzymatycznej możemy te dwie rodziny hydrolaz glikozydowych zaklasyfikować, jako enzymy zachowujące (należy tu rodzina GH-18) lub inwertujące (GH-19) konfigurację na anomerycznym atomie węgla w powstałym produkcie. Enzymy zachowujące wykorzystują tzw. mechanizm pojedynczego podstawienia, natomiast inwertujące podwójnego podstawienia reszt aminokwasowych w miejscu aktywnym [8].

Chitynazy roślinne stanowią bardzo zróżnicowaną grupę. Shinshi i wsp. [67] jako pierwsi zaproponowali podział chitynaz roślinnych na 3 klasy strukturalne, obecnie podział obejmuje aż 7 klas (I-VII) w obrębie dwu rodzin hydrolaz GH-19 i GH-18 (ryc. 2).

Chitynazy z klasy I, II, IV, VI, VII należą do rodziny GH-19. Analiza filogenetyczna chitynaz z klasy I, II i IV sugeruje większą ewolucyjną odległość pomiędzy chitynazami z klasy IV a tymi z klas I i II [20]. Klasa I chitynaz zawiera wysoce konserwatywną strukturę główną domeny katalitycznej, wraz z niewielkim, bogatym w glicynę i prolinę regionem oddzielającym od bogatej w cysteinę N-końcowej domeny. Określana jest ona, jako domena podobna do heweiny – lektyny wiążącej chitynę z drzewa gumowego (ang. *Hevein-like domain*) lub domena wiązania chityny (ang. *Chitin-Binding Domain*, CBD) [18]. Klasa I podzielona jest na podklasy



RYCINA 2. Klasyfikacja i budowa chitynaz roślinnych. sekwencja sygnalna; domena wiązania chityny; region zawiasowy; domeny katalityczne
FIGURE 2. Classification and structure of plant chitinases. the signal sequence; chitin binding domain; a hinge region; catalytic domain

o wzorach Ia i Ib, które zawierają odpowiednio chitynazy kwaśne i zasadowe. Chitynazy należące do klasy II posiadają strukturę główną domeny katalitycznej wysoce homologiczną do klasy I chitynazy, jednak brakuje im domeny bogatej w cysteinę (CBD), a także regionu zawiasowego. Ponadto klasa I chitynaz występuje tylko u roślin, a chitynazy klasy II także u grzybów i bakterii. Chitynazy klasy IV zbudowane są z regionu zawiasowego, a także obu domen, tj. katalitycznej i wiązania chityny. Uważa się, że klasa IV ewoluowała z klasy I poprzez serię czterech delecji, które spowodowały zmniejszenie liczby miejsc wiążących GlcNAc oraz zaburzenia w sekwencji odpowiedzialnej za kierowanie do wakuoli, co doprowadziło do ich wydzielania w apoplaście [56, 79]. Najmniej poznane są chitynazy z klasy VI i VII. Wiadomo, że enzymy z klasy VI posiadają obie domeny (katalityczną i CBD), jednak ze względu na modyfikacje polegające na zmniejszeniu domeny katalitycznej do regionu bogatego w glicynę i prolinę oraz przycięcie domeny CBD, znacznie różnią się od tych z klasy I i klasy IV. Natomiast chitynazy klasy VII zbudowane są z domeny katalitycznej, która wykazuje duże podobieństwo do tej z klasy IV oraz sekwencji sygnalnej [6, 58].

Chitynazy z klasy III i V należą do rodziny 18 hydrolaz glikozydowych (GH-18). Roślinne chitynazy klasy III posiadają domenę katalityczną, jednak brak im domeny wiążącej chitynę (CBD) oraz regionu zawiasowego. Chitynazy klasy III wykazują szeroki zakres punktu izoelektrycznego, aktywność w szerokim zakresie pH i stabilność w temperaturach 60-70ºC. Natomiast klasa V chitynaz posiada powie-

loną domenę wiązania chityny. Chitynazy z klasy III i V, mimo że należą do tej samej rodziny hydrolaz, wykazują stosunkowo niskie podobieństwo w sekwencji aminokwasowej domeny katalitycznej (<15% podobieństwa) [46, 47]. Co więcej, ich unikalna struktura i dodatkowa aktywność lizozymu upodabnia je do chitynaz bakteryjnych.

Duża różnorodność w strukturze chitynaz roślinnych wynika z ewolucyjnych zmian w świecie roślin. Aby poznać fundamentalną rolę chitynaz roślinnych, zbadano chitynazy pochodzące z roślin ewolucyjnie starszych od okrytonasiennych, między innymi chitynazy paproci – *Pteris ryukyuensis* [49] i sagowca – *Cycas revoluta* [73]. Najnowsze badania strukturalne i fizjologiczne dotyczą chitynaz pochodzących z roślin nienaczyniowych. Badania chitynaz u mchów mogą prowadzić do lepszego zrozumienia podstawowego znaczenia tych enzymów w królestwie roślin [48, 67, 74].

ROLA ROŚLINNYCH CHITYNAZ

Roślinne chitynazy zostały odkryte przez Bernarda w 1911 roku, który wykazał ich działanie antygrzybowe [65]. Chitynazy zostały wykryte i przebadane u bardzo wielu gatunków roślin w różnych organach i tkankach, takich jak korzenie, bulwy, pędy, liście, kwiaty, zarodki, nasiona i owoce, protoplasty mezofilu i komórki epidermy [62]. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że synteza chitynaz odbywa się niemal na każdym etapie rozwoju rośliny. Enzymy te uczestniczą we wzroście wegetatywnym, począwszy od fazy embrionalnej, kiełkowania nasion, poprzez rozwój siewki, aż do procesów generatywnych związanych z kwitnieniem oraz dojrzewaniem owoców (tab. 1).

Chitynazy produkowane podczas wzrostu i rozwoju roślin mogą zabezpieczać rośliny przed zewnętrznymi czynnikami stresowymi, np. patogenami, a także często uczestniczą bezpośrednio w procesach związanych z rozwojem wegetatywnym i generatywnym. Ich rola w rozwoju roślin może być dwojaka, z jednej strony uczestniczą w rozluźnianiu struktury ścian komórkowych, a ponadto stwierdzono, że niektóre chitynazy mogą brać udział w transdukcji sygnału. Związane jest to z tym, że substratem dla chitynazy, oprócz chityny, są także białka arabinogalaktanowe (AGP), których część zawiera reszty N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) [69]. AGP pełnią funkcję strukturalną łącząc ściany komórkowe z błoną plazmatyczną i cytoszkieletem, ale także uczestniczą w wielu procesach biologicznych, w tym podziale komórek, zaprogramowanej śmierci komórki, zróżnicowaniu i ekspansji komórek, embriogenezie oraz interakcjach żywiciel/drobnoustrój [38]. Potwierdzono, iż białka te mogą być hydrolizowane przez chitynazę do oligosacharydów, co prowadzi do rozluźnienia struktury ścian komórkowych, a ponadto powstałe w wyniku tej reakcji chitooligosacharydy stają się cząsteczkami sygnalnymi regulującymi wiele procesów rozwoju roślin [54].

TABELA 1. Udział roślinnych chitynaz w rozwoju roślin
TABLE 1. Plant chitinases in plant development

Chitynazy w różnych stadiach rozwoju rośliny	Klasa chitynazy	Roślina	Źródło
		Stadia wegetatywne:	
Faza embrionalna	*	*Zea mays* L.(Kukurydza zwyczajna)	[5]
	IV	*Picea abies* L. (Świerk pospolity)	[87]
	III	*Arabidopsis thaliana* L. (Rzodkiewnik pospolity)	[50]
	*	*Pinus nigra* Arn. (Sosna czarna)	
	*	*Abies alba* Mill. x *A. cephalonica* Loudon (Jodła biała x Jodła grecka);	[15]
		Abies alba Mill. x *A. numidica* (Jodła biała x Jodła numidyjska)	[15]
Kiełkowanie nasion	III	*Dactylis glomerata* L. (Kupkówka pospolita)	[78]
	III	*Punica granatum* L. (Granatowiec właściwy)	[36, 91]
	I	*Glycine max* L. (Soja warzywna)	[17]
	II, III	*Cucumis melo* L. (Ogórek melon)	[86]
	*	*Hordeum* L. (Jęczmień)	[25]
Rozwój siewek	I	*Lycopersicum esculentum* Mill. (Pomidor zwyczajny)	[89]
	IV	*Araucaria angustifolia* Kuntze (Araukaria brazylijska)	[12]
	IV	*Arabidopsis thaliana* L. (Rzodkiewnik pospolity)	[50]
	II	*Nicotiana tabacum* L. (Tytoń szlachetny)	[53]
	III	*Adenanthera pavonina* L. (Gruczołkowiec pawi)	[63]
		Stadia generatywne:	
Kwitnienie	IV	*Arabidopsis thaliana* L. (Rzodkiewnik pospolity)	[50]
	I	*Oryza sativa* L. (Ryż siewny)	[76]
	I	*Metroxylon sagu* Rottb (Sagownica zwyczajna)	[59]
Przekwitanie	IV	*Erysimum linifolium* L. (Pszonak)	[56]
	II	*Dimocarpus longan* Lour. (Longan)	[90]
	II	*Lycopersicum esculentum* Mill.(Pomidor zwyczajny)	[39]
Dojrzewanie owoców	*	*Musa acuminata Colla. (Bananowiec)*	[77]
	III	*Musa acuminata Colla. (Bananowiec)*	[35]

* brak danych dotyczących klasy badanych chitynaz

ROLA CHITYNAZ W ROZWOJU WEGETATYWNYM

Jak już wspomniano chitynazy uczestniczą w rozwoju wegetatywnym poczynając od rozwoju zarodka, kiełkowaniu nasion, aż do wzrostu siewki. Chitynazy, podobnie jak glukanazy i transferazy lipidowe, należą do zewnątrzkomórkowych białek regulujących proces embriogenezy zygotycznej i somatycznej [15]. Ich rola w tych procesach polega prawdopodobnie na modyfikacji ściany komórkowej komórek roślinnych, poprzez hydrolizę zawartych w niej oligomerów składających się z przynajmniej trzech reszt N-acetylglukozaminy [11, 37]. Ponadto

w embriogenezie zygotycznej chitynazy mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów między zarodkiem, a odżywiającym je bielmem wykorzystując do tego celu wspomniane już wcześniej oligosacharydy powstałe po hydrolizie AGP [5, 7, 54]. Wzajemne powiązania między zarodkiem i bielmem należą do trudnych do badania ze względu na fakt, że rozwijają się one głęboko w tkankach matecznych. Jednym ze sposobów pokonania tej bariery jest wykorzystanie procesów somatycznej embriogenezy w warunkach *in vitro*. W kulturach haploidalnych zarodków pochodzących z mikrospor kukurydzy wykryto obecność AGP, dwie izoformy chitynazy i inne enzymy hydrolityczne oraz powstałe na skutek ich aktywności oligosacharydy. Skorelowano obecność AGP ze stymulacją embriogenezy [5]. AGP działa promująco na proces somatycznej embriogenezy u marchwi, w szczególności w połączeniu z chitynazami, ponieważ dodanie endochitynazy (EP3) do kultur marchwi prowadzonych w obecności AGP dodatkowo stymulowało embriogenezę [80]. Białko wyizolowane z zarodków zygotycznych i somatycznych świerka pospolitego (*Picea abies*) posiadało aktywność chitynolityczną i po dalszych analizach zostało przyporządkowane do IV klasy chitynaz. Obserwowano zwiększoną ekspresję genów kodujących tę chitynazę (*Chia4-Pa*) po przeniesieniu komórek masy proembriogeniczej na pożywkę bez regulatorów wzrostu [86]. Chitynazę klasy III scharakteryzowaną u *Arabidopsis* (*AtEP3/AtchitIV*) uznano za specyficzną dla procesu embriogenezy somatycznej, choć jest obecna także w pyłku oraz bielmie, a nawet rosnących korzeniach włośnikowych i podsadkach liściowych [50]. Także w kulturach zawiesinowych innych roślin iglastych wykryto chitynazy. W pożywce z kulturą sosny czarnej (*Pinus nigra*) wykryto dwanaście, natomiast w kulturach hybrydowych jodły białej (*Abies alba* x *A. cephalonica* oraz *Abies alba* x *A. numidica*) dziewięć izoform chitynazy. Wskazuje to na dużą zmienność chitynaz i niewątpliwie ich znaczenie we wzroście i rozwoju zarodków somatycznych [15]. W hodowli zawiesinowej trzech lini embriogennych i trzech nieembriogennych kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.) stwierdzono różnice w obecności chitynazy. Endochitynaza klasy III obecna była w pożywkach z hodowlą linii embriogennych, nie stwierdzono jej natomiast w przypadku linii nieembriogennych. Dlatego chitynazy mogą być traktowane jako potencjalny marker embriogeniczności [77]. Stwierdzono także, że obecność chitynazy kontroluje przejście zarodka ze stadium globularnego do sercowatego [9].

Chitynazy występujące w nasionach są bardzo zróżnicowane i należą do klasy I, II, III, IV i VII. Udowodniono, że chitynazy mogą odgrywać znaczącą rolę w kiełkowaniu nasion. Chitooligosacharydy obecne w komórkach okrywy nasiennej są rozkładane przez te enzymy, a to z kolei dzięki rozluźnieniu struktury okrywy nasiennej, umożliwia wyłonienie korzonka zarodkowego [18]. Chitynazę klasy III znaleziono w nasionach granatu, chociaż nie stwierdzono jej w okrywie nasiennej i w liściach, co może wskazywać na to, że chitynaza jest aktywna głównie w zarodku. Obecność chitynazy potwierdzono także w amyloplastach. Dalsze

badania wykazały, że chitynaza ulega degradacji podczas kiełkowania nasion, co może wskazywać na jej rolę w tym procesie [90]. Rozważano także możliwość uczestniczenia chitynazy w dostarczaniu jonów wapnia do komórek. Chitynazy mają zdolność wiązania jonów wapnia w stosunku około dziesięciu moli jonów Ca^{2+} na mol białka. Możliwe, że chitynazy są odpowiedzialne za magazynowanie tych jonów, co reguluje wiele procesów fizjologicznych w tym kiełkowanie nasion [36]. Chitynazy klasy I obecne są w dojrzewających nasionach i strąkach soi jak również w korzeniach i liściach tej rośliny. Słabą ekspresję chitynazy klasy I zaobserwowano także na późniejszym etapie rozwoju zarodka [17]. W dojrzewających nasionach melona poczynając od 40 dnia po kwitnieniu do osiągnięcia przez nie dojrzałości, wykryto jedną formę kwasową i dwie zasadowe chitynaz, przy czym w bielmie ujawniono izoformy kwaśne i zasadowe, a w osi zarodka zasadowe. Dwie sekwencje uzyskane z nasion melona zidentyfikowano jako chitynazę klasy II (*CmChi2*) i III (*CmChi1*), a poziom ich ekspresji rósł w trakcie kiełkowania nasion, co powiązano z pojawieniem się korzenia zarodkowego [85]. Podobnych obserwacji dokonano na jęczmieniu. Chitynazy o masie 28 i 33 kDa zlokalizowano w warstwie aleuronowej i bielmie w rozwijających się i kiełkujących ziarniakach, natomiast nie stwierdzono ich w zarodkach. Zaobserwowano także gromadzenie mRNA kodującego chitynazy podczas dojrzewania ziarniaków jęczmienia [25]. W nasionach pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) chitynazy należące do klasy I razem z β-1,3-glukanazą wykazują podwyższoną aktywność w mikropylarnych tkankach podczas imbibicji nasion przed przebiciem się korzenia zarodkowego w trakcie skiełkowania nasion. Nie potwierdzono jednak, aby enzymy te ułatwiały przebicie korzenia wykorzystując mechanizm hydrolizy tkanek i modyfikacji ściany komórkowej podczas kiełkowania nasion pomidora [88]. Chitynazy klasy IV w powiązaniu z białkami arabinogalaktanowymi uczestniczą w dojrzewaniu nasion *Araucaria angustifolia* [12]. Pojawienie się chitynaz w rozwijających się nasionach często związane jest również z zabezpieczeniem ich przed atakiem patogenów grzybowych, tak jak w przypadku ziarniaków owsa [71], nasion traganka [31] i fasoli [82]. Enzymy te hydrolizują ścianę komórkową grzybów, a przez to zapobiegają infekcji.

Wielokrotnie izolowano chitynazy z siewek różnych gatunków roślin, takich jak sorgo [23], daglezja zielona [24], bawełna [4], ciecierzyca [14], gdzie uczestniczyły w obronie tych roślin przed infekcją patogenami grzybowymi. Rola chitynaz we wzroście roślin nie jest do końca poznana, chociaż potwierdzono korelację między wzrostem aktywności tych enzymów, a wyższym wigorem siewek transformowanego tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [53]. Obserwowano także wzrost zawartości chitynaz, wraz z rozwojem siewek gruczołkowca pawiego (*Adenanthera pavonina*) [63].

Roślinne białka chitynolityczne, w szczególności chitynazopodobne (ang. *chitinese-like*,CTL) biorą także udział w procesie biosyntezy ściany komórkowej [45]. Mutacja genu kodującego CTL1 u *Arabidopsis* doprowadziła do ektopowe-

go odkładania się ligniny we wtórnej ścianie komórkowej, zmniejszenia długości korzeni i hipokotyli oraz zwiększenia liczby korzeni włośnikowych [96]. Również u *Arabidopsis* Sánchez-Rodríguez i wsp. [62] zaobserwowali koekspresję CTL i syntazy celulozy (CESA). Dodatkowo wysnuli hipotezę, że CTL łączy się z pojawiającymi się w apoplaście mikrofibrylami celulozy, co w konsekwencji może wpływać na właściwości strukturalne celulozy.

ROLA CHITYNAZ W ROZWOJU GENERATYWNYM

W rozwoju generatywnym roślin, chitynazy pojawiają się na etapie indukcji kwitnienia. Chitynazy wykryto w kwiatach wielu roślin, te należące do klasy I znaleziono m. in. w kwiatach tytoniu [40], *Arabidopsis* [61] oraz ryżu [32], natomiast należące do klasy II w kwiatach pietruszki [55], ziemniaka [85] oraz pomidora [21]. Chitynazy klasy III (*AtEP3/AtchitIV*) znaleziono jak już wspomniano wcześniej w okrywie nasiennej i bielmie podczas kiełkowania nasion, a także podczas rozwoju generatywnego, w dojrzałym i kiełkującym pyłku [50]. Stwierdzono bardzo wysoki konstytutywny poziom ekspresji genu chitynazy klasy I w pręcikach i słupkach kwiatów ryżu, a jednocześnie nie stwierdzono jej w organach wegetatywnych, nawet po traktowaniu czynnikami stresowymi, zarówno chemicznymi takimi jak etefon, kwas salicylowy, chitozan jak i fizycznymi, takimi jak promieniowanie UV i zranienie. Chitynaz mogą więc odgrywać rolę w rozwoju kwiatów i również w tym przypadku pełnić funkcję enzymu „rozluźniającego" ściany komórkowe koniecznego do szybkiej ekspansji komórek [76]. W kwiatach sagowca (*Metroxylon sagu*) występują chitynazy klasy I, które na bardzo niskim poziomie były ekspresjonowane również w liściach i merystemie [59]. Ponadto chitynazy licznie pojawiają się w starzejących się i opadających płatkach kwiatów, np. *Erysimum linifolium* [56], *Dimocarpus longan* [90], czy pomidora [39], co może się wiązać z tym, że chitynazy uczestniczą w rozpuszczaniu ścian komórkowych lub separacji komórek, które zachodzą podczas starzenia się i opadania płatków [34].

Znaczny wzrost ekspresji genu chitynazy (*MaCHtt*) w dojrzewających owocach banana, w szczególności w późniejszych etapach rozwoju owoców, tj. 95 dni i więcej od kwitnienia, świadczy o udziale tych enzymów w tych procesach. Chitynazy mają też znaczenie podczas dojrzewania posprzętnego owoców banana. Poziom ekspresji genu *MaCHtt* maksymalny poziom osiąga w 18 dniu od zerwania owoców. Autorzy podkreślają, iż chitynazy w owocach pojawiają się konstytutywnie, a poziom jej ekspresji rośnie wraz z osiąganiem dojrzałości przez owoce [77]. Do podobnych wniosków doszli badacze sprawdzając ekspresję genu chitynazy (*MaEChI1*) w liściach, a także w kwiatach i w owocach banana. Dalsze badania potwierdziły stopniowy wzrost ekspresji tego genu w trakcie dojrzewania posprzętnego, co przełożyło się także na wzrost aktywności enzymatycznej endochi-

tynazy w 20 dniu po zbiorach. Ponadto badaczom udało się powiązać szczyt ekspresji genu chitynazy ze szczytem produkcji biorącego udział w dojrzewaniu owoców etylenu oraz możliwość regulowania przez endogenny etylen ekspresji tego genu, co jednoznacznie wskazuje na rolę endochitynazy w dojrzewaniu owoców [35].

ROLA CHITYNAZ W INTERAKCJI ROŚLINY ZE ŚRODOWISKIEM

Chitynazy, które pojawiają się podczas rozwoju rośliny spełniają także funkcje wynikające z interakcji rośliny ze środowiskiem. Niektóre z chitynaz mogą być reprezentowane w roślinie konstytutywnie lub mogą być indukowane przez czynniki stresowe zarówno abiotyczne jak i biotyczne. Chitynazy uczestniczą w reakcji roślin na stres abiotyczny spowodowany m.in. niskimi temperaturami [19, 94, 97] czy metalami ciężkimi [27, 42, 43, 82, 84], a także mają istotne znaczenie w kontakcie z mikroorganizmami, biorąc udział zarówno w symbiozie z bakteriami [64, 79] jak i z grzybami mikoryzowymi [13, 16] oraz w patogenezie [10, 31, 52, 69, 73, 92, 95]. Odgrywają także znaczącą rolę w interakcji rośliny z owadami, uczestnicząc w obronie przed atakiem insektów [28, 30], a nawet w zdobywaniu substancji odżywczych przez rośliny owadożerne [51, 65].

PODSUMOWANIE

Chitynazy stanowią bardzo złożoną rodzinę białek enzymatycznych hydrolizujących nie tylko chitynę, ale także białka arabidogalaktanowe. Mogą być ekspresjonowane konstytutywnie i angażować się w wiele procesów związanych z rozwojem rośliny, ale także indukowane w wielu organach roślinnych pod wpływem stresów abiotyczny i biotycznych. W przeciwieństwie do ich znaczenia w odpowiedzi na czynniki biotyczne i abiotyczne, ich rola w rozwoju roślin nie została jeszcze dostatecznie zbadana. Wiadomo, że uczestniczą w embriogenezie, kiełkowaniu, oraz we wzroście siewek. Bardzo znaczącą rolę odgrywają też w formowaniu i opadaniu kwiatów oraz dojrzewaniu owoców. Przypuszcza się, że ma to związek z reorganizacją ściany komórkowej. Znaczącą rolę odgrywają tu białka arabinogalaktanowe, których hydroliza powoduje ponadto uwalnianie oligosacharydów stanowiących cząsteczki sygnalne w wielu procesach związanych z rozwojem roślin. Poznanie dokładnego mechanizmu działania chitynaz może przyczynić się do poszerzenia wiedzy dotyczącej ich udziału w rozwoju roślin, oraz wykorzystania jej w praktyce w farmakologii, ze względu na powstające z ich udziałem chitooligosacharydy o właściwościach antynowotworowych i przeciwzapalnych.

LITERATURA

[1] Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sorlie M, Varum KM, Eijsink VG. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. Mar Drugs 2010; **8**: 1482-1517.

[2] Adrangi S, Faramarzi MA. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. Biotech Adv 2013; **31**: 1786-1795.

[3] Andersen OA, Dixon MJ, Eggleston IM, van Aalten DM. Natural product family 18 chitinase inhibitors. Nat Prod Rep 2005; **22**: 563-579.

[4] Asran-Amal A, Moustafa-Mahmoud SM, Sabet KK, el Banna OH. *In vitro* antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. Saudi J Biological Sci 2010; **17**: 153-157.

[5] Borderies G, le Bechec M, Rossignol M, Lafitte C, le Deunff E, Beckert M, Dumas C, Matthys–Rochon E. Characterisation of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. Eur J Cell Biol 2004; **83**: 205-212.

[6] Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M. Substrate of tobacco chitinases. Plant J 1998; **14**: 225-234.

[7] Cairney J, Pullman GS. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. New Phytol 2007; **176**: 511-536.

[8] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res. 2009; **37:** 233-238.

[9] De Jong AJ, Hendriks T, Meijer EA, Penning M, Lo Schiavo F, Terzi M, van Kammen A, de Vries SC. Transient reduction in secreted 32kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant ts11. Dev Genet 1995; **16**: 332-343.

[10] Do Amaral DOJ, de Almeida CMA, Correia MTDS, de Menezes Lima VL, da Silva MV. Isolation and characterization of chitinase from tomato infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. J Phytopathol 2012; **160**: 741-744.

[11] Domon J-M, Neutelings G, Roger D, David A, David H. A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribaea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. J Plant Physiol 2000; **156**: 33-39.

[12] Dos Santos ALW, Wiethölter N, Elgueddari NE, Moerschbacher BM. Protein expression during seed development of *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. Physiol Plant 2006; **127**: 138-148.

[13] Elfstrand M, Feddermann N, Ineichen K, Nagaraj VJ, Wiemken A, Boller T, Salzer P. Ectopic expression of the mycorrhiza-specific chitinase gene *Mtchit 3-3* in *Medicago truncatula* root-organ cultures stimulates spore germination of glomalean fungi. New Phytol 2005; **167**: 557-570.

[14] Faruk MI, Rahman ML, Islam MN, Rahman MM, Rahman MA. Management of chickpea seedling diseases through soil amendment with tricho-compost. *Int J Phytopathol* 2014*;* **3***:* 73-79.

[15] Fráterová L, Salaj T, Matušíková I, Salaj J. The role of chitinases and glucanases in somatic embriogenesis of black pine and hybrid firs. Cent Eur J Biol 2013; **8**: 1172-1182.

[16] Frettinger P, Herrmann S, Lapeyrie F, Oelmüller R, Buscot F. Differential expression of two class III chitinases in two types of roots of *Quercus robur* during pre-mycorrhizal interactions with *Piloderma croceum*. Mycorrhiza 2006; **16**: 219-223.

[17] Gijzen M, Kuflu K, Qutob D, Chernys JT. A class I chitinase from soybean seed coat. J Exp Bot 2001; **52**: 2283-2289.

[18] Gomez L, Allona I, Casado R, Aragoncillo C. Seed chitinases. Seed Sci Res 2002; **12**: 217-230.

[19] Gupta R, Deswal R. Refolding of β-stranded class I chitinases of *Hippophae rhanmoides* enhances the antifreeze activity during cold acclimation. PLoS One 2014; **9**: e91723.

[20] Hamel F, Boivin R, Tremblay C, Bellemare G. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. J Mol Evol 1997; **44**: 614-624.

[21] Harikrishna K, Jampates-Beale R, Milligan SB, Gasser CS. An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. Plant Mol Biol 1996; **30**: 899-911.
[22] Hartl L, Zach S, Seidl-Seiboth V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol 2012; **93**: 533-43.
[23] Huang L-D, Backhouse D. Analysis of chitinase isoenzymes in sorghum seedlings inoculated with *Fusarium thapsinum* or *F. proliferatum*. Plant Sci 2006; **171**: 539-545.
[24] Islam MA, Sturrock RN, Williams HL, Ekramoddoullah AK. Identification, characterization, and expression analyses of class II and IV chitinase genes from Douglas-fir seedlings infected by *Phellinus sulphurascens*. Phytopathol 2010; **100**: 356 -366.
[25] Jacobsen S, Mikkelsen JD, Hejgaard J. Characterization of two antifungal endochitinases from barley grain. Physiol Plant 1990; **79**: 554-562.
[26] Kasprzewska A. Plant chitinases-regulation and function. Cell Mol Biol Lett 2003; **8**: 809-824.
[27] Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, Hausman JF, Renaut J. Quantative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. Proteomics 2008; **8**: 2514-2530.
[28] Kitajima S, Kamei K, Taketani S, Yamaguchi M, Kawai F, Komatsu A, Inukai Y. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insencticidal activity. BMC Biochem 2010; **11**: 6.
[29] Klis FM, Boorsma A, de Groot PW. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2006; **23**: 185-202.
[30] Kolosova N, Breuil C, Bohlmann J. Cloning and characterization of chitinases from interior spruce and lodgepole pine. Phytochem 2014, doi:10.1016/j.phytochem.2014.02.006.
[31] Kopparapu NK, Liu Z, Fei F, Yan Q, Jiang Z. Purification and characterization of a chitinase (sAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*. Process Biochem 2011; **46**: 1370-1374.
[32] Lamb CJ, Zhu Q, Yamamoto RT, Beeche A, Nelson AJ, Lawton MA. Defense gene regulation. In: Rice Genetics II, International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 1991; 529-537.
[33] Larsen T, Petersen BO, Storgaard BG, Duus JO, Palcic MM, Leisner JJ. Characterization of a novel *Salmonella typhimurium* chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetyllactosamine conjugate. Glycobiology 2011; **21**: 426-36.
[34] Lewis MW, Leslie ME, Liljegren SJ. Plant separation: 50 ways to leave your mother. Curr Opin Plant Biol 2006; **9**: 59-65.
[35] Liu J-H, Zhang J, Xu B-Y, Zhang J-B, Jia C-H, Wang J-S, Jin Z-Q. Expression analysis of banana *MaECHI1* during fruit ripening with different treatments. Afr J Biotechnol 2012; **11**: 12951-12957.
[36] Lv C, Masuda T, Yang H, Sun L, Zhao G. High-capacity calcium-binding chitinase III from pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.) is located in amyloplasts. Plant Signal Behav 2011; **6**: 1963-1965.
[37] Malinowski R, Filipecki M. The role of cell wall in plant embryogenesis. Cell Mol Biol Lett 2002; **7**: 1137-1151.
[38] Marzec M, Szarejko I, Melzer M. Arabinogalactan proteins are involved in root hair development in barley. J Exp Bot 2014; doi: 10.1093/jxb/eru47.
[39] Meir S, Philosoph-Hadas S, Sundaresan S, Vijay-Selvaraj KS, Burd S, Ophir R, Kochanek B, Reid MS, Jiang CZ, Lers A. Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. Plant Physiol 2010; **154**: 1929-1956.
[40] Memelink J, Linthorst JMH, Schilperoort RA, Hoge JHC. Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. Plant Mol Biol 1990; **14**: 119-126.
[41] Merzendorfer H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. Eur J Cell Biol 2011; **9**: 759-769.
[42] Mészáros P, Rybanský Ľ, Hauptvogel P, Kuna R, Libantová J, Moravčíková J, Piršelová B, Tirpáková I, Matušíková I. Cultivar-specific kinetics of chitinase induction in soybean roots during exposure to arsenic. Mol Biol Rep 2013; **40**: 2127-2138.
[43] Mészáros P, Rybanský Ľ, Spieß N, Socha P, Kuna R, Libantová J, Moravčíková J, Piršelová B, Hauptvogel P, Matušíková I. Plant chitinase responses to different metal-type stresses reveal specifity. Plant Cell Rep 2014; **33**: 1789-1799.

[44] Mizuno R, Fukamizo T, Sugiyama S, Nishizawa Y, Kezuka Y, Nonaka T, Suzuki K, Watanabe T. Role of the loop structure of the catalytic domain in rice class I chitinase. J Biochem 2008; **143**: 487-495.
[45] Mokshina N, Gorshkova T, Deyholos MK. Chitinase-like (*CTL*) and cellulose synthase (*CESA*) gene expression in gelatinous-type cellulosic walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) bast fibers. PLoS ONE 2014; **9**: e97949.
[46] Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Inanaga H, Okazaki Y, Shinya S, Kondo K, Fukuda T, Fukamizo T. Crystal structure and chitin oligosaccharide-binding mode of a 'loopful' family GH19 chitinase from rye, *Secale cereale*, seeds. FEBS J 2012; **279**: 3639-3651.
[47] Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Mizuhara M, Lampela O, Juffer AH, Skriver K, Fukamizo T. A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. Planta 2011; **234**: 123-137.
[48] Ohnuma T, Umemoto N, Taira T, Fukamizo T, Numata T. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an active-site mutant of "loopless" family GH19 chitinase from *Bryum coronatum* in a complex with chitotetraose. Acta Crystallogr 2013; **69**: 1360-1362.
[49] Onaga S, Taira T. A new type of plant chitinase containing LysM domains from a fern (*Pteris ryukyuensis*): Roles of LysM domains in chitin binding and antifungal activity. Glycobiology 2008; **18**: 414-423.
[50] Passarinho PA, van Hengel AJ, Fransz PF, de Vries SC. Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana AtEP3/AtchitIV* endochitinase gene. Planta 2001; **212**: 556-567.
[51] Paszota P, Escalante-Perez M, Thomsen LR, Risør MW, Dembski A, Sanglas L, Nielsen TA, Karring H, Thøgersen IB, Hedrich R, Enghild JJ, Kreuzer I, Sanggaard KW. Secreted major *Venus flytrap* chitinase enables digestion of Arthropod prey. Biochem Biophys Acta 2014; **1844**: 374-383.
[52] Patel AK, Singh VK, Yadav RP, Moir AJG, Jagannadham MV. Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea.* Process Biochem 2010; **45**: 675-681.
[53] Patil VR, Widholm JM. Possible correlation between increased vigour and chitinase activity expression in tobacco. J Exp Bot 1997; **481**: 1943-1950.
[54] Pilling E, Höfte H. Feedback from the wall. Curr Opin Plant Biol 2003; **6**: 611-616.
[55] Ponath Y, Vollberg H, Hahlbrock K, Kombrink E. Two differentially regulated class II chitinases from parsley. Biol Chem 2000; **381**: 667-578.
[56] Price AM, Orellana DFA, Salleh FM, Stevens R, Acock R, Buchanan-Wollaston V, Stead AD, Rogers HJ. A comparison of leaf and petal senescence in wall flower reveals common and distinct patterns of gene expression and physiology. Plant Physiol 2008; **147**: 1898-1912.
[57] Price NPJ, Naumann TA. A high-throughput matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry-based assay of chitinase activity. Anal Biochem 2011; **411**: 94-99.
[58] Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R, Buffard D. Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. Plant Sci 2002; **162**: 389-400.
[59] Roslan HA, Anji SB. Characterization of inflorescence-predominant chitinase gene in *Metroxylon sagu* via differential display. 3 Biotech 2011; **1**: 27-33.
[60] Sahai AS, Manocha MS. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. FEMS Microbiol Rev 1993; **11**: 317-338.
[61] Samac DA, Shah DM. Developmental and pathogen induced activation of the *Arabidopsis* acidic chitinase promoter. Plant Cell 1991; **3**: 1063-1072.
[62] Sánchez-Rodríguez C, Bauer S, Hématy K, Saxe F, Ibáñez AB, Vodermaier V, Konlechner C, Sampathkumar A, Rüggeberg M, Aichinger E, Neumetzler L, Burgert I, Somerville C, Hauser M-T, Persson S. CHITINASE-LIKE1/POM-POM1 and its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. The Plant Cell 2012; **24**: 589-607.
[63] Santos I, Oliveira A, da Cunha M, Machado O, Neves-Ferreira A, Fernandes K, Carvalh A, Perales J, Gomes V, Cho H. Expression of chitinase in *Adenanther apavonina* seedlings. Physiol Plant 2007; **131**: 80-88.
[64] Schultze M, Staehelin C, Brunner F, Genetet I, Legrand M, Fritig B, Kondorosi È, Kondorosi Á. Plant chitinase/lysozyme isoforms show distinct substrate specifity and cleavage site preference towards lipochitooligosaccharide Nod signals. Plant J 1998; **16**: 571-580.

[65] Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, Knudsen AD, Bemm F, Thøgersen IB, Bra Utigam A, Thomsen LR, Schliesky S, Dyrlund TF, Escalante-Perez M, Becker D, Schultz J, Karring H, Weber A, Højrup P, Hendrich R, Enghild JJ. The protein composition of the digestive fluid from the *Venus flytrap* shed light on prey digestion mechanisms. Mol Cell Proteom 2012; **11**: 1306-1319.

[66] Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Gupta VK. Role of chitinase in plant defense. Asian J Biochem 2011; **6**: 29-37.

[67] Shinshi H, Neuhas JM, Ryals J, Meins F Jr. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. Plant Mol Biol 1990; **14**: 357-368.

[68] Shinya S, Urasaki A, Ohnuma T, Taira T, Suzuki A, Ogata M, Usui T, Lampera O, Juffer AH, Fukamizo T. Interaction of di-N-acetylchitobiosylmoranoline with a family GH19 chitinase from moss, *Bryum coronatum*. Glycobiology 2014; **24**: 945-955.

[69] Shoresh M, Harman GE. Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. BMC Plant Biol 2010; **10**: 136.

[70] Showalter AM. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. Cell Mol Life Sci 2001; **58**: 1399-1417.

[71] Sinha M, Singh RP, Kushwaa GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. Scientific World J 2014; Article ID 543195.

[72] Sørensen HP, Madsen LS, Petersen J, Andersen JT, Hansen AM, Beck HC. Oat (*Avena sativa*) seed extract as an antifungal food preservative through the catalytic activity of a highly abundant class I chitinase. Appl Biochem Biotechnol 2010; **160**: 1573-1584.

[73] Su Y, Xu L, Fu Z, Yang Y, Guo J, Wang S, Que Y. *ScChi*, encoding an acidic class III chitinase of sugarcane, confers positive responses to biotic and abiotic stresses in sugarcane. Int J Mol Sci 2014; **15**: 2738-2760.

[74] Taira T, Hayashi H, Tajiri Y, Onaga S, Uechi Gi, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo TA. Plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): Biochemical characterization, cDNA isolation, and post-translational modification. Glycobiology 2009; **19**: 1452-1461.

[75] Taira T, Mahoe Y, Kawamoto N, Onaga S, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T. Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*). Glycobiology 2011; **21**: 644-654.

[76] Takakura Y, Ito T, Saito H, Inoue T, Komari T, Kuwata S. Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Mol Biol 2000; **42**: 883-897.

[77] Tang W, Zhu S, Li L, Liu D, Irving DE. Differential expressions of PR1 and chitinase genes in harvested bananas during ripening, and in response to ethephon, benzothiadizole and methyl jasmonate. Postharvest Biol Tech 2010; **57**: 86-92.

[78] Tchorbadjieva MI, Pantchev IY. Secretion of a chitinase-like protein in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. Biol Plantarum 2006; **50**: 142-145.

[79] Tian Y, Liu W, Cai J, Zhang L-H, Wong K-B, Feddermann N, Boller T, Xie Z-P, Staehelin C. The Nod factor hydrolase of *Medicago truncatula*: Characterization of an enzyme specifically cleaving rhizobial nodulation signals. Plant Physiol 2013; **163**: 1179-1190.

[80] Ubhayasekera W, Rawat R, Ho SW, Wiweger M, von Arnold S, Chye ML, Mowbray SL. The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. Plant Mol Biol 2009; **71**: 277-289.

[81] van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries SC. N-Acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. Plant Physiol 2001; **125**: 1880-1890.

[82] Van Keulen H, Wei R, Cutright TJ. Arsenate-induced expression of a class III chitinase in the dwarf sunflower *Helianthus annuus*. Environ Exp Bot 2008; **63**: 281-288.

[83] Wang S, Shao B, Fu H, Rao P. Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. Appl Microbiol Biotechnol 2009; **85**: 313-321.

[84] Wani PA, Khan MS, Zaidi A. Toxic effects of heavy metals on germination and physiological processes of plants. In Zaidi A, Wani PA, Khan MS eds. Toxicity of Metals to Legumes and Bioremediation. Springer-Verlag Wien, 2012; 45-66.
[85] Wemmer T, Kaufmann H, Kirch HH, Schneider K, Lottspeich F, Thompson RD. The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.) is an endochitinase. Planta 1994; **194**: 264-273.
[86] Witmer X, Nonogaki H, Beerse P, Bradford KJ, Welbaumg E. Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds. Seed Sci Res 2003; **13**: 167-178.
[87] Wiweger M, Farbos I, Ingouff M, Langercrantz U, Von Arnold S. Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes Turing somatic and zygotic embryo development in Norway spruce *(Picea abies):* similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. J Exp Bot 2003; **54**: 2691-2699.
[88] Wu B, Zhang B, Dai Y, Zhang L, Shang-Guan K, Peng Y, Zhou Y, Zhu Z. Brittle culm15 encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. Plant Physiol 2012; **159**: 1440-1452.
[89] Wu C-T, Leubner-Metzger G, Meins F, Bradford KJ. Class I β-1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. Plant Physiol 2001; **126:** 1299-1313.
[90] Xie D, Liang W, Xiao X, Liu X, Chen L, Chen W. Molecular cloning and characterization of a chitinase gene up-regulated in longan buds during flowering reversion. Afr J Biotechnol 2011; **10**: 12504-12511.
[91] Yang H, Zhang T, Masuda T, Lv C, Sun L, Qu G, Zhao G. Chitinase III in pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.): a high-capacity calcium-binding protein in amyloplasts. The Plant J 2011; **68**: 765-776.
[92] Zarandi HS, Bagheri A, Baghizadeh A, Moshtaghi N. Quantitative analysis of chitinase gene expression in chickpea. Russ J Plant Physl 2011; **58**: 681-685.
[93] Zhang J, Zhang X, Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Ma E, Zhu KY. Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). PLoS One 2011; **6**.
[94] Zhang S-H, Wei Y, Liu J-L, Yu H-M, Yin J-H, Pan H-Y, Baldwin TC. An apoplastic chitinase CpCHT1 isolated from the corolla of wintersweet exhibits both antifreeze and antifungal activities. Biol Plantarum 2011; **55**: 141-148.
[95] Zhao M, Ma Y, Pan YH, Zhang CH, Yuan WX. A hevein-like protein and a class I chitinase with antifungal activity from leaves of the paper mulberry. Biomed Chromatogr 2011; **25**: 908-912.
[96] Zhong RQ, Kays SJ, Schroeder BP, Ye ZH. Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. Plant Cell 2002; **14**: 165-179.
[97] Żur I, Gołębiowska G, Dubas E, Golemiec E, Matušiková I, Libantová J, Moravčíková J. β-1,3-glucanase and chitinase activities in winter triticales during cold hardening and subsequent infection by *Microdochium nivale.* Biologia 2013; **68**: 241-248

Redaktor prowadzący – Andrzej Kononowicz

Otrzymano:21.03.2015
Przyjęto:08.12.2015
Ewa Kępczyńska
Katedra Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński
ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin
tel. : 91 444 16 93
e-mail: ekepcz@wp.pl