

CHITYNAZY JAKO KLUCZ DO INTERAKCJI POMIĘDZY ROŚLINAMI I MIKROORGANIZMAMI

Anna Kisiel*, Katarzyna Jęckowska

Instytutu Nauk o Morzu i Środowisku, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło we wrześniu 2018, zaakceptowano w sierpniu 2019 r.

Streszczenie: Chityna jest głównym składnikiem strukturalnym komórek grzybów i egzoszkieletów owadów. Komórki roślinne i bakteryjne są wyposażone w chitynazy, enzymy zdolne do hydrolizy chityny. Uczestniczą one w wielu interakcjach między organizmami, w tym w symbiozie i antagonizmie. Te interakcje są istotnymi czynnikami wielu funkcji ekosystemów i są ważne dla zdrowia roślin i zwierząt. Ponadto, ze względu na wspólne zajęcie siedlisk, grzyby i bakterie angażują się w złożone interakcje, które prowadzą do krytycznych zmian w zachowaniu mikroorganizmów, przykładem czego są bakterie endosymbiotyczne grzybów mikoryzowych. Chitynazy są przedmiotem zainteresowania w dziedzinie nauk o środowisku, medycynie i biotechnologii. Niniejszy przegląd opisuje rolę chitynaz roślinnych i bakteryjnych we wzajemnych interakcjach.

1. Wprowadzenie. 2. Zróżnicowanie chitynaz. 3. Chitynazy w interakcjach ze środowiskiem. 3.1. Chitynazy roślinne w interakcjach z mikroorganizmami. 3.2. Chitynazy bakteryjne w interakcjach z innymi mikroorganizmami. 4. Praktyczne zastosowanie chitynaz. 5. Podsumowanie

CHITINASES AS THE KEY TO THE INTERACTION BETWEEN PLANTS AND MICROORGANISMS

Abstract: Chitin is the main structural component of fungal cells and of the exoskeletons of insects. Plant and bacterial cells are equipped with chitinases, enzymes that break down chitin. Chitinases participate in many interactions between organisms, including symbiosis and antagonism. These interactions are significant drivers of many ecosystem functions and are important for the health of plants and animals. Additionally, due to the common occupation of habitat, fungi and bacteria engage in complex interactions that lead to critical changes in the behavior of microorganisms like endosymbiotic bacteria of mycorrhizal fungi. Thus, chitinases are of interest in environmental science, medicine and biotechnology. The present review describes the role of plant and bacterial chitinases in mutual interactions.

1. Introduction. 2. Differentiation of chitinases. 3. Chitinases in interactions with the environment. 3.1. Plant chitinases in interactions with microorganisms. 3.2. Bacterial chitinases in interactions with other microorganisms. 4. Practical application of chitinases. 5. Summary

Słowa kluczowe: chitynazy, interakcje mikrobiologiczne, stres biotyczny i abiotyczny, symbioza, patogeny grzybowe, odporność roślin
Key words: chitinases, microbiological interactions, biotic and abiotic stress, symbiosis, fungal pathogens, plant defense response

1. Wprowadzenie

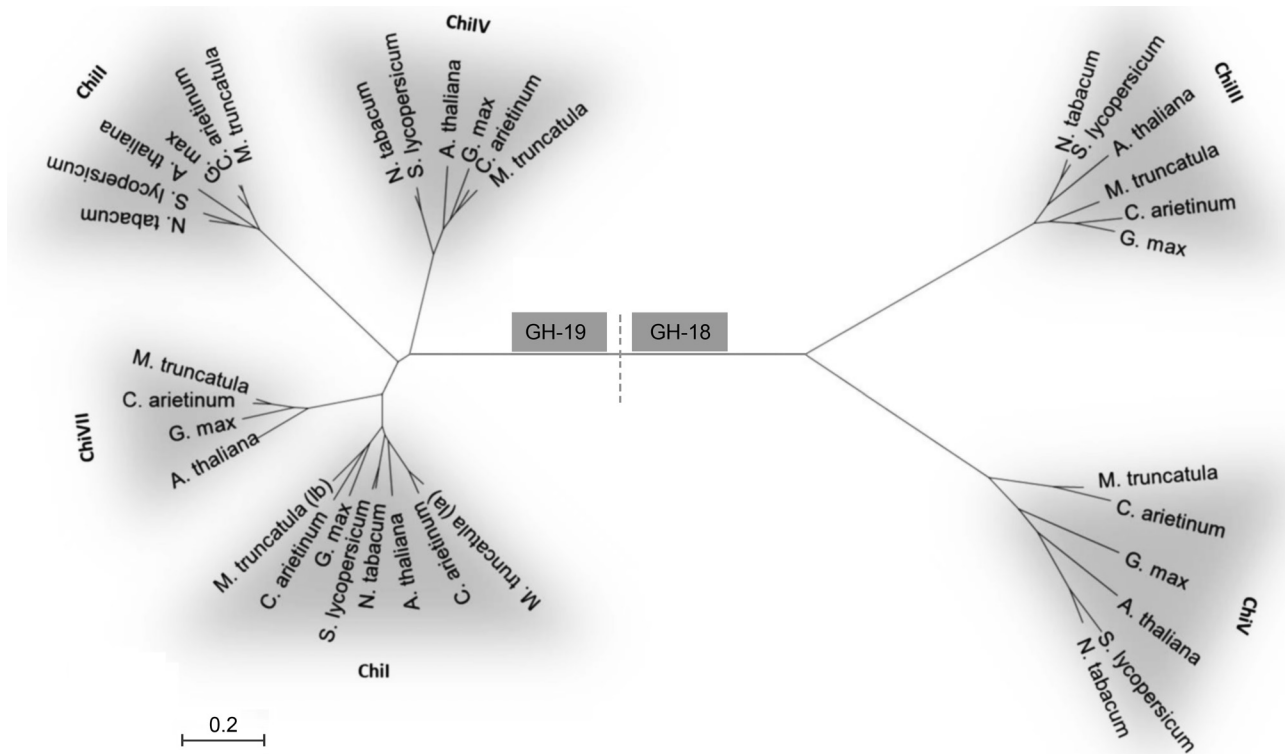
Hydrolazy glikozydowe (GH), czyli enzymy hydrolizujące wiązania glikozydowe w polisacharydach, oligosacharydach i glikozydach są bardzo liczną grupą enzymów reprezentowaną przez 115 rodzin. Wśród nich znajdują się chitynazy reprezentujące rodziny GH-18, GH-19, GH-23 i GH-48 [1], które są zdolne do hydrolizy nierozpuszczalnego polimeru β -1,4-N-acetyloglukozaminy (GlcNAc), którym jest chityna. Jest ona jednym z najczęściej występujących w przyrodzie polisacharydów i można ją znaleźć w ścianach komórkowych grzybów, w szkieletach owadów i skorupiaków oraz ich jajach, a także muszlach mięczaków, jednak co istotne nie stwierdzono jej u kręgowców.

Chitynaza katalizuje hydrolizę wiązań pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich N-acetyloglukoz-

min w łańcuchu chityny i jest produkowana przez wiele organizmów [42, 43]. Bakterie wytwarzają chitynazy należące głównie do rodziny GH-18, ale także GH-19 i GH-23 [49]. Do rodziny GH-18 należą wszystkie chitynazy grzybowe [31], oraz wytwarzane przez owady [105]. Chitynazy zwierzęce oraz ludzkie należą do rodziny GH-18 i uważa się, że odgrywają znaczącą rolę w niektórych chorobach w szczególności tych wywołanych przez patogeny grzybowe [64, 68, 95]. Bardzo zróżnicowaną grupę stanowią chitynazy roślinne zaklasyfikowane do dwóch rodzin hydrolaz glikozydowych GH-18 i GH-19 i obejmujące aż siedem klas [47].

W niniejszej pracy dokonano przeglądu wiedzy dotyczącej roli chitynaz roślinnych oraz bakteryjnych w kontakcie ze środowiskiem ze szczególnym uwzględnieniem interakcji z mikroorganizmami. Ze względu na ogromną różnorodność chitynaz dotyczącą zarówno ich

* Autor korespondencyjny: dr inż. Anna Kisiel, Instytutu Nauk o Morzu i Środowisku, Uniwersytet Szczeciński, ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin; tel. 91 4441555, e-mail: anna.kisiel@usz.edu.pl



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne przedstawiające ewolucyjne podobieństwo chitynaz u różnych taksonów. Stworzone na podstawie sekwencji aminokwasowych metodą najbliższego sąsiedztwa (Neighbor-Joining) z wykorzystaniem programu Mega 7.0. W celu porównania zestawiono następujące gatunki: *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik), *Nicotiana tabacum* (tytoń), *Solanum lycopersicum* (pomidor), *Cicer arietinum* (ciecierzyca), *Glycine max* (soja), *Medicago truncatula* (lucerna).

filogenezy, budowy strukturalnej oraz różnych funkcji jest to bez wątpienia temat interesujący, a jednocześnie wymagający usystematyzowania.

2. Zróżnicowanie chitynaz

Chitynazy roślinne zaliczamy do rodziny 18 i 19 hydrolaz glikozydowych, które dodatkowo podzielono na 7 klas od I do VII (Ryc. 1). Klasa I dzieli się na dwie podklasy Ia (chitynazy kwaśne) i Ib (chitynazy zasadowe). Analiza filogenetyczna tych dwóch rodzin wykazuje znaczne różnice w sekwencji aminokwasowej i białkowej, co potwierdza tezę o ich różnym pochodzeniu ewolucyjnym [62].

Do rodziny GH 19 należą chitynazy roślinne z klasy I, II, IV oraz mało poznane VI i VII. Klasy I i IV posiadają w swojej budowie oprócz domeny katalitycznej (CatD – Catalytic Domain), także domenę wiązania chityny (CHBD – chitin-binding domain) oraz region zawiasowy. Domeny CatD oraz CHBD posiadają również chitynazy z klasy VI jednak znacznie różniące się od tych z klasy I i klasy IV głównie ze względu na modyfikacje prowadzące do ich skrócenia. Chitynazy klasy II i VII zbudowane są z domeny katalitycznej, która wykazuje duże podobieństwo do domeny CatD z klasy IV. Natomiast należące do rodziny GH 18 chi-

tynazy z klasy III i V posiadają domenę katalityczną bez domeny wiążącej chitynę oraz regionu zawiasowego [42, 90]. Tak duża różnorodność budowy strukturalnej chitynaz roślinnych wynika głównie z ewolucyjnych zmian w świecie roślin.

Bakteryjne chitynazy należą głównie do rodziny 18 hydrolaz glikozydowych choć niektóre z nich produkowane przez bakterie z rodzaju *Streptomyces* zostały zaklasyfikowane do rodziny GH 19 [49]. Bakteryjne chitynazy z rodziny GH 18 posiadają domenę katalityczną, domenę wiążącą chitynę, a także domeny fibronektyny III (FnIII – fibronectins III domain) lub kadheryny. W oparciu o homologię sekwencji oraz różnice w strukturze chitynaz z rodziny GH 18 domeny zostały podzielone na trzy podrodziny A, B, i C. Podrodzina A posiada dodatkowy region fałdowania $\beta+\alpha$, który pogłębia szczelinę centrum aktywnego, którego nie posiadają podrodziny B i C [80]. Z kolei domeny katalityczne chitynaz należących do GH 19 są bogate w struktury α -helikalne [45].

Zróżnicowanie na poziomie sekwencji i struktury genów kodujących chitynazy ma swoje przełożenie w funkcjonowaniu tych enzymów. Chitynazy są bardzo zróżnicowaną grupą enzymów. Różnią się od siebie aktywnością optimum temperaturowym i pH, oraz rozmiarem. Ich wielkość waha się od 20 kDa do około 120 kDa przy czym wielkość większości bakteryj-

nych chitynaz mieści się w zakresie od ~ 20 do 60 kDa, a wielkość chitynaz roślinnych mieści się w zakresie ~ 25–40 kDa [43].

3. Chitynazy w interakcjach ze środowiskiem

Od czasu odkrycia w 1911 roku chitynazy zidentyfikowano u licznych gatunków roślin we wszystkich organach i tkankach, w trakcie całego rozwoju rośliny [42]. Wiadomo, że aktywność niektórych chitynaz w roślinie może przejawiać się na stałym poziomie, ale są też indukowane przez czynniki stresowe (Tabela I). Chitynazy odgrywają szczególną rolę w interakcji rośliny ze środowiskiem i odpowiedzi na czynniki abiotyczne i biotyczne.

W odpowiedzi na warunki środowiska uczestniczą głównie chitynazy roślinne z klasy I. Są one aktywne podczas stresu abiotycznego spowodowany m.in. metalami ciężkimi [39, 60, 61] czy niskimi temperaturami [29, 107]. Metale ciężkie są toksyczne dla organizmów żywych, w tym roślin, głównie poprzez inaktywację enzymów, zaburzenia funkcji błon komórkowych oraz utratę ich ciągłości [99]. Zmniejszeniu ulega sucha masa, zawartość azotu i ilość białka w roślinie, a wysokie stężenia metali ciężkich mogą prowadzić do obumarcia całej rośliny [23]. Ponadto roślinom na

niektórych obszarach grożą uszkodzenia powodowane mrozem, dlatego wykształciły mechanizmy pozwalające na uniknięcie lub ograniczenie skutków działania niskich temperatur. Polegające głównie na syntezie białek AFP (Antifreeze Proteins), do których również zaliczane są chitynazy [102]. Pomimo, że chitynazy nie posiadają specyficznej domeny wiążącej lód (IBD – Ice-Binding Domain), jednak mają zdolność do przyjęcia trójwymiarowej struktury umożliwiającej im wiązanie kryształów lodu (IBS – Ice-Binding Surface) [100].

Chitynazy roślinne oraz bakteryjne mają kluczowe znaczenie w interakcjach z organizmami żywymi. Można wyróżnić dwie główne funkcje chitynaz, jako cząsteczki sygnałowe konieczne w interakcjach symbiotycznych roślin zarówno z bakteriami jak i grzybami oraz jako enzymy wykorzystywane do zwalczania biologicznego grzybów oraz owadów [44, 55]. Możliwe jest również wykorzystanie bakteryjnych chitynaz jako bioinsektycydów [43].

3.1. Chitynazy roślinne w interakcjach z mikroorganizmami

Gleba jest środowiskiem życia wielu mikroorganizmów takich jak bakterie czy grzyby strzępkowe. Wśród nich są drobnoustroje patogenne, ale duża ich część wchodzi w symbiozę z roślinami [72]. Symbiotyczne

Tabela I
Chitynazy roślinne uczestniczące w interakcjach ze środowiskiem

Interakcje ze środowiskiem		Klasa chitynazy	Roślina	Źródło
Czynniki abiotyczne	Metale ciężkie	I	<i>Populus L.</i> (topola)	[36]
		–	<i>Glycine max</i> (soja)	[57, 58]
	Niskie temperatury	–	<i>Chimonanthus praecox L.</i> (zimokwiat)	[100]
		I	<i>Hippophae hamnoides</i> (rokitnik zwyczajny)	[29]
Czynniki biotyczne	Symbioza roślin z bakteriami	III, IV, V	<i>Medicago truncatula</i>	[11, 72, 73, 86, 99]
	Symbioza roślin z AMF	III	<i>Medicago truncatula</i>	[8, 18]
		III	<i>Quercus robur</i> (dąb szypułkowy)	[19]
		III	<i>Vitis amurensis</i> (winorośl amurska)	[45]
	Obrona przed patogenami grzybowymi	I, III	<i>Cicer arietinum L.</i> (ciecierzyca)	[97]
		III	<i>Lycopersicon esculentum</i> (pomidor)	[17]
		III	<i>Saccharum officinarum</i> (trzcina cukrowa)	[83]
		I	<i>Morus papyrifera L.</i> (morwa papierowa)	[101]
		I	<i>Zea mays L.</i> (kukurydza)	[16, 77]
		–	<i>Astragalus membranaceus</i> (traganek błoniasty)	[41]
		–	<i>Phaseolus vulgaris</i> (fasola zwyczajna)	[92]
		–	<i>Ipomoea carnea</i> subsp. <i>Fistulosa</i> (wilec)	[67]
		I, II, III, IV, V	<i>Gossypium barbadense</i> (bawełna peruwiańska)	[95]
	I	<i>Solanum tuberosum</i> (ziemniak)	[79]	
Obrona przed insektami Zdobywanie substancji odżywczych	–	<i>Populus trichocarpa × P. deltoids</i> (topola)	[48]	
	–	<i>Morus sp.</i> (morwa)	[39]	

mikroorganizmy stymulują wzrost roślin poprzez mechanizmy pośrednie i bezpośrednie. Do pośrednich mechanizmów promocji wzrostu zalicza się indukcję odporności oraz zwalczanie patogenów. Z kolei bezpośrednia promocja wzrostu polega na syntezie hormonów roślinnych, udostępnianiu roślinom żelaza, fosforu oraz azotu [8, 54, 70].

Rośliny bobowate mają zdolność do wytwarzania brodawek korzeniowych, w których znajdują się symbiotyczne bakterie (ryzobia), należące m.in. do rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Sinorhizobium* [13, 59]. Kolonizacja powierzchni korzeni przez bakterie powoduje wydzielanie przez komórki korzeni flawonoidów. W odpowiedzi ryzobia wytwarzają oligosacharydy lipochityny określane jako czynniki brodawkowania – NF (Nod factors, nodulation factors). Zapoczątkowują one specyficzne odpowiedzi makroorganizmu prowadzące do powstania brodawek [32, 71]. Czynniki Nod zbudowane są z łańcucha powtarzających się cząsteczek N-acetylglukozyminy i ze względu na strukturalne podobieństwo do cząsteczki chityny, mogą być hydrolizowane przez chitynazy znajdujące się w komórkach roślinnych, co prowadzi do inaktywacji tychże czynników. Prawdopodobnie w ten sposób enzymy kontrolują proces infekcji [80]. Rośliną modelową wykorzystywaną do badania interakcji symbiotycznych jest *Medicago truncatula*. Badania dowodzą, że kluczową rolę w indukcji symbiozy pomiędzy roślinami a ryzobiami odgrywają białka roślinne podobne do chitynaz z klasy V. Inokulacja korzeni wpływa na zwiększenie ekspresji genu kodującego MtNFH1 (*Medicago truncatula* Nod factor hydrolase 1) Enzym ten wykazuje strukturalne podobieństwo do chitynaz z klasy V [12, 92, 106]. Salzer i wsp. [79] wykazali, że *Sinorhizobium meliloti* wpływa na ciągły wzrost ekspresji chitynazy V w korzeniach *M. truncatula* w kolejnych dniach po inokulacji. Również potraktowanie roślin tylko czynnikami brodawkowania dało podobny efekt. Po inokulacji obserwowano u *M. truncatula* wzrost ekspresji genu kodującego chitynazy z klasy III i IV [78].

Mikoryza arbuskularna jest przykładem interakcji pomiędzy roślinami a drobnoustrojami, w której biorą udział chitynazy roślinne. Partnerami grzybów arbuskularnych (*Glomeromycota*) są przede wszystkim rośliny zielne oraz niektóre gatunki drzew. Podobnie jak bakterie symbiotyczne tworzą one specyficzne struktury w korzeniach roślin zwane arbuskulami [7, 109]. Wykazano, że grzyby arbuskularne indukują w roślinach ekspresję genu kodującego chitynazę klasy III [9, 18, 50]. Ekspresjonowana w korzeniach dębu (*Quercus robur*) chitynaza III najprawdopodobniej jest związana z początkowymi etapami zawiązywania ektomikoryzy [19]. Znaczenie chitynaz w mikroryzy może być dwojakie. Przypuszcza się, że enzym inaktywuje chitynowe elicytory uwalniane ze ściany komórkowej grzy-

bów. W ten sposób nie dopuszcza do rozwinięcia się mechanizmów obronnych rośliny [9, 77]. Inna hipoteza sugeruje, że chitynazy stymulują kiełkowanie zarodników grzybowych [18].

Chociaż wiadomo już, że bakterie również są obecne podczas mikoryzy (np. jako endofityczne bakterie grzybów mikroryzowych) jednak do tej pory nie jest jeszcze poznana ich rola ani mechanizmy uruchamiane w tym procesie [14].

Rośliny w toku ewolucji wykształciły mechanizmy chroniące je przed atakiem patogenów grzybowych. Należą do nich m.in. wzmacnianie i pogrubianie ściany komórkowej [57], wybuch wolnych rodników [76], wytwarzanie związków chemicznych takich jak fitoaleksyny [27], saponiny [6], glikozydy cyjanogenne i związki fenolowe [21]. Do białek aktywowanych podczas odpowiedzi na czynniki stresowe należą białka związane z patogenezą zwane białkami PR (PR – Pathogenesis Related). Na podstawie homologii sekwencji aminokwasowych, właściwości biochemicznej i aktywności biologicznej podzielono je na 17 rodzin [87]. Do grupy białek PR zaliczane są również chitynazy, które przyporządkowano do rodziny PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 (Tabela II). Synteza enzymów chitynolitycznych jest więc ważnym elementem odporności roślin [22, 44, 98].

Poziom chitynaz w niezainfekowanych komórkach roślinnych zwykle jest niski, a synteza chitynaz oraz β -1,3-glukanaz jest w znacznym stopniu indukowana infekcją patogenu [28]. Wzmoczoną ekspresję genów kodujących chitynazy powodują dodatkowo kwas jasmonowy (JA) i kwas abscysynowy (ABA) [69]. Chitynazy obecne w apoplazmie komórek roślinnych odgrywają ważną rolę we wczesnych etapach patogenezы. Jak już wspomniano, rozkładając ścianę komórkową powodują uwolnienie oligomerów chityny, które stają się cząsteczkami sygnałnymi. Komórki roślinne rozpoznają je dzięki obecności receptorów kinazo podobnych LysM RLK (LysM Receptor-Like Kinase). Cząsteczki LysMRLK po rozpoznaniu przez receptory w komórkach roślinnych powodują aktywację chitynaz występujących w wakuoli, które degradują nowo syntezowane łańcuchy chityny, ograniczając wzrost grzyba [83].

Zaobserwowano, że mutacja w genie kodującym ten receptor u *Arabidopsis* prowadzi do zmniejszonej ekspresji genów kodujących białka obronne (w tym chitynaz), co powoduje większą wrażliwość roślin na infekcje grzybowe [97]. Udział chitynaz w transdukcji sygnału możliwy jest również dzięki temu, że substratem dla tych enzymów są reszty N-acetylglukozyminy (GlcNAc) białek arabinogalaktanowych (AGP), które znajdują się w ścianach komórkowych i uczestniczą w szlakach sygnałnych [85]. Potwierdzono, iż białka AGP mogą być hydrolizowane przez chitynazy oraz glukanazy do oligosacharydów, co prowadzi do rozluźnienia struktury ścian komórkowych. Powstałe

Tabela II
Rodziny białek PR

Rodzina	Białko	Właściwości, działanie
PR-1	PR-1 a, PR-1 b i PR-1 c	przeciwwgrzybowe
PR-2	β -1,3-Glukanazy	hydroliza β -1,3-głukan
PR-3	Chitinazy (klasa I, II, IV, V, VI i VII)	hydroliza chityny
PR-4	Chitinazy (klasa I i II)	hydroliza chityny (przeciwwgrzybowe)
PR-5	Taumatyno-podobne	przeciwwgrzybowe
PR-6	Inhibitor (pomidor)	inhibicja proteinaz
PR-7	Endoproteinaza P (pomidor)	hydroliza białek
PR-8	Chitynaza (ogórek)	hydroliza chityny
PR-9	Peroksydaza	udział w lignifikacji
PR-10	“PR-1” Bet v 1, Mal d 1, Api g 1i Dau c (pietruszka) – rybonukleazo-podobne	przeciwwgrzybowe
PR-11	Chitynaza V (tytoń)	hydroliza chityny
PR-12	Rs-AFP3 (rzodkiewka) – defensyna	przeciw -bakteryjne, -grzybowe, -wirusowe
PR-13	sTHI2.1 (rzodkiewnik) – tionina	przeciw -bakteryjne, -grzybowe, -wirusowe
PR-14	LTP4 9 (jęczmień)	transport lipidów, przeciwwgrzybowe
PR-15	OxOa (jęczmień)- oksydazy szczawianowe	Generowanie wolnych rodników, przeciw -bakteryjne,
PR-16	OxOLP (jęczmień) – podobne do oksydaz szczawianowych	-grzybowe, -wirusowe
PR-17	PRp27 (tytoń)	nieznane

Na podstawie [80], zmodyfikowane.

w ten sposób chitoooligosacharydy stają się cząsteczkami sygnałnymi biorącymi udział w wielu procesach w roślinach [85]. AGP pełnią funkcję strukturalną łącząc ściany komórkowe z błoną plazmatyczną i cytoszkieletem oraz uczestniczą w wielu procesach biologicznych, w tym podziale komórek, embriogenezie, zaprogramowanej śmierci komórki, różnicowaniu i ekspansji komórek oraz interakcjach żywicieli/drobnoustrój [56]. Powstałe po hydrolizie AGP oligosacharydy β -1,3-głukanu i chityny stają się elicytorami uczestniczącymi w transdukcji sygnału, co prowadzi do uruchomienia miejscowej i ogólnoustrojowej reakcji obronnej [5].

Aby potwierdzić rolę chitynaz w reakcjach obronnych roślin na patogeny grzybowe przeprowadzono doświadczenia na ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.), pomidorze (*Lycopersicon*) oraz trzcinie cukrowej (*Saccharum officinarum*) [17, 90, 103]. Badania dowiodły, że w kontakcie z patogenem dochodzi do ekspresji genów kodujących I oraz III klasę roślinnych chitynaz. Białko wyizolowane z nasion fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) [98] i traganka błoniastego (*Astragalus membranaceus*) [46] hamowało wzrost m.in. *Botrytis cinerea* i *Fusarium oxysporum*, natomiast w ekstrakcie liściowym morwy papierowej (*Broussonetia papyrifera*) obecna była chitynaza klasy I skuteczna wobec *Trichoderma viridae* [108]. Aktywność chitynaz wyizolowanej z lateksu wilca *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* potwierdzono na płytkach z glikolem chityny [73]. U kukurydzy, chitynaza 2 powodowała odporność na grzyba *Fusarium graminearum* [16]. Wytypowano aż 8 genów kodują-

cych chitynazy pięciu klas u bawełny (*Gossypium barbadense*), które mogą być odpowiedzialne za jej odporność przeciwko patogenowi grzybowemu *Verticillium dahliae*. Ekspresja sześciu genów w tym należących do klasy I (*Chi2*, *Chi17*), klasy V (*Chi14*, *Chi23*), klasy IV (*Chi28*) i klasy II (*Chi32*) znacząco wzrosła po inokulacji *V. dahliae*, osiągając szczyt w 96 godzinie, dwa pozostałe geny z klasy III (*Chi25*) i klasy V (*Chi47*) osiągnęły szczyt ekspresji w 48 godziny po inokulacji. Potwierdzono, iż geny *Chi25* i *Chi47* odgrywają znaczącą rolę jako geny oporności na zakażenia bawełny patogenem *V. dahliae* i można je wykorzystać do hodowli bawełny odpornej na choroby [101].

Co ciekawe endofityczne symbiotyczne grzyby z rodzaju *Trichoderma* mają właściwość stymulacji odporności roślin przeciwko innym grzybom poprzez wpływ na ekspresję genów kodujących chitynazy u roślin. Shores i Harman [84] przeprowadzili doświadczenia na kukurydzy (*Zea mays* L.). Wykazali, że rośliny zainokulowane *T. harzianum* w większym stopniu hamowały wzrost patogena grzybowego *Penicillium digitatum* niż rośliny kontrolne. Było to wynikiem zwiększonej aktywności chitynaz w roślinie. Zauważono też zmiany w heterodimerze chitynazy złożonym z egzo- i endoenzymu, gdzie część endo różniła się między roślinami skolonizowanymi *T. harzianum* i roślinami kontrolnymi i wykazywała wyższą aktywność antygrzybiczą.

Chitynazy roślinne znalazły również szerokie zastosowanie w biotechnologiach, w tym w zielonej biotechnologii. Fitopatogeny grzybowe stanowią duże

zagrożenie dla plonów roślin uprawnych. Stosowane przez rolników środki ochrony roślin mogą wywierać negatywny wpływ na środowisko oraz prowadzić do rozwoju odporności. W związku z tym prowadzi się próby modyfikacji roślin metodami inżynierii genetycznej w celu ograniczenia ich wrażliwości na atak patogenów grzybowych, co w konsekwencji prowadzi do mniejszych strat w plonach. Gen chitynazy pochodzący z ryżu (*Rchit*) został wprowadzony do trzech odmian orzeszków ziemnych (*Arachis hypogaea* L.). Spowodowało to zwiększoną aktywność chitynolityczną w orzeszkach, które wykazywały wyższy poziom odporności na zakażenia *Aspergillus flavus* [74] oraz *Cercospora arachidicola* [35]. U herbaty (*Camellia sinensis* L.) transformowanej chitynazą klasy I pochodzącą z ziemniaka (*Solanum tuberosum*) wykazano pozytywną korelację pomiędzy poziomem ekspresji transgenu a stopniem odporności na infekcje *Exobasidium vexans*, co spowodowało wzrost jej odporności na patogen grzybowy powodujący nekrotyczne zmiany na liściach [86]. Chitynazą klasy II pochodzącą z jęczmienia (*Hordeum vulgare*) o potwierdzonej w warunkach *in vitro* aktywności antygrzybiczej przeciwko *Alternaria solani* transformowano ziemniaka, który następnie wykazywał odporność na porażenie tym patogenem [38].

W celu komercyjnego wykorzystania chitynaz należy pozyskać białka w znaczących ilościach wykorzystując tzw. systemy ekspresyjne. W ten sposób pozyskiwano także rekombinowane chitynazy pochodzenia roślinnego o aktywności antygrzybiczej. Wykorzystując jako system ekspresyjny drożdże *Pichia pastoris* pozyskano chitynazy klasy I z wspanięgi wężowatej (*Vigna unguiculata*) o aktywności przeciwko *Penicillium herquei* [48], z kukurydzy o aktywności przeciwko *Fusarium graminearum* [16]. Wykorzystując bakteryjny system ekspresyjny jakim jest *Escherichia coli* uzyskano chitynazę z klasy I pochodzącą z pietruszki (*Hordeum vulgare* L.) o potwierdzonej aktywności przeciwko *Alternaria solani*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* i *Verticillium dahliae* [93].

3.2. Chitynazy bakteryjne w interakcjach z innymi mikroorganizmami

Potwierdzono kluczową rolę chitynaz roślinnych w symbiozie z bakteriami jednak na temat roli chitynaz bakteryjnych w tym procesie nadal niewiele wiadomo. Szczepy bakterii symbiotycznych izolowanych z brodawek cechują się aktywnością chitynolityczną co może wskazywać na znaczenie dla samego procesu. Spośród 26 szczepów *Rhizobium* wyizolowanych z brodawek korzeniowych *Sesbania sesban* 12 szczepów wykazywało aktywność chitynaz. Jeden z tych szczepów sprawdzono pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej przeciwko *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Curvu-*

laria lunata, *Fusarium oxysporum* i *Fusarium udum*. Wyniki sugerują rolę ochronną enzymów podczas symbiozy [88]. W brodawkach korzeniowych innych roślin w tym *Vigna trilobata* stwierdzono występowanie endofitycznych, niesymbiotycznych bakterii jak *Bacillus altitudinis*, *Paenibacillus* sp., *Ensifer xinjiangense* i *Agrobacterium tumefaciens*, u których potwierdzono produkcję chitynazy [47].

Zajmowanie przez bakterie i grzyby wspólnych siedlisk doprowadziło do powstawania mieszanych społeczności. Społeczności takie występują w prawie wszystkich ekosystemach i obejmują gatunki drobnoustrojów z wielu różnych rodzin grzybów i bakterii. Interakcje między nimi nazwano bakteryjno-grzybowymi (BFI – Bacterial-Fungal Interactions) [15, 20]. Jednym z takich ekosystemów gdzie kształtują się zależności między bakteriami i grzybami jest gleba, być może dzięki temu jest ona jednocześnie największym źródłem bakterii chitynolitycznych, ponieważ chitynazy bakteryjne dzięki zdolności do hydrolizy chityny są w stanie trawić ściany komórkowe grzybów.

Wśród najważniejszych taksonów w mikrobiologicznej społeczności gleby znajdują się promieniowce (*Actinobacteria*), które jednocześnie znane są z produkcji antybiotyków i metabolitów wtórnych [26]. Ponadto z analizy publicznych baz danych wynika, że prawie połowa genomów bakterii zawierających chitynazę należy właśnie do promieniowców. Autorzy uważają, że glebowe promieniowce są najlepiej przystosowane do korzystania z szerokiej gamy zasobów chityny, ponieważ w swoim genomie posiadają największą liczbę genów kodujących chitynazy oraz najwyższą różnorodność modułów wiążących węglowodany [4]. Niezwykła skuteczność chitynaz w przypadku promieniowców należących do rodzaju *Streptomyces*, wynika w dużej mierze z powodu ich zdolności do penetrowania chityny strzępkami [4]. Ponadto produkują one więcej niż jedną chitynazę, często też jednocześnie chitynazy należące do dwu rodzin hydrolaz glikozydowych GH 18 i GH 19, jak w przypadku *Streptomyces coelicolor* czy *Nocardioopsis prasina* [37, 94]. Szczepy należące do *Streptomyces* oraz wyizolowane z nich chitynazy wykazują silne właściwości antygrzybicze. Oczyszczona chitynaza pochodząca ze *Streptomyces rimosus* wykazywała przeciwgrzybicze właściwości *in vitro* przeciw *Fusarium solani* i *Alternaria alternata* [11]. Potwierdzono, że chitynazy należące do rodziny GH 19 również wykazują silne działanie antygrzybicze, jak w przypadku siedmiu szczepów syntetyzujących chitynazy GH 19 o właściwościach przeciwgrzybiczych przeciwko jednemu lub więcej grzybów należących do *Fusarium oxysporum*, *Pythium aristosporum*, *Colletotrichum gossypii* i *Rhizoctonia solani* [24].

Wśród bakterii należących do typu *Firmicutes* również znajduje się wiele szczepów produkujących chi-

tynaz, najczęściej szczepy należące do *Bacillus thuringiensis* [4, 96]. Wykazano ich szeroką aktywność antygrzybową przeciwko m.in. *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pythium* [25, 53].

Do aktywności chitynolitycznej zdolne są także Proteobakterie. Bakterie należące do rodzaju *Serratia*, *Pseudomonas* i *Enterobacter* wykazują szerokie działanie antygrzybicze. Obok promieniowców do najlepiej poznanych bakterii produkujących chitynazę należą szczepy *Serratia marcescens*. Bakterie te są w stanie uruchomić do hydrolizy chityny cały układ enzymatyczny i produkować jednocześnie kilka chitynaz należące do rodziny GH 18, z podrodziny A, B i C, co zwiększa wydajność hydrolizy chityny [91]. Wykazano skuteczność chitynazę pochodzącej ze szczepów *S. marcescens* przeciwko *Botrytis cinerea* [89], a także pochodzącą z *S. marcescens* B4A przeciwko *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris* sp, *Alternaria raphani*, *Alternaria brassicicola* [104]. Wiele bakterii z rodzaju *Pseudomonas* jest zdolnych do produkcji chitynaz i aktywności przeciwko grzybom. Aktywność taką potwierdzono u *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, który został wyizolowany z ryzosfery żeńszczenia. Filtrat z hodowli prowadzonej z dodatkiem chityny, cechował się zdolnością do hamowania wzrostu *Fusarium solani* o ponad 57%, podczas gdy filtrat pozbawiony białek tylko o 10%. Dodatkowo poprzez mutacje w genie kodującym chitynazę potwierdzono ich znaczny udział w hydrolizie ścian komórkowych *F. solani*, które aż w 47% składają się z chityny [52]. Z kolei produkujący chitynazę *Pseudomonas* sp. MSSRFD41 ograniczał wzrost *Phacelia grisea* [82]. Również szczepy fluorescencyjne należące do *Pseudomonas* wykazywały aktywność przeciwko patogenom grzybowym, m.in. *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe grisea* [3, 33, 67].

Dzięki zdolności chitynaz bakteryjnych do ograniczenia rozwoju grzybów mogą być one wykorzystywane jako biofungicydy do zwalczania fitopatogenów grzybowych co stanowi alternatywę dla chemicznych środków ochrony roślin [43].

Bardzo specyficzną i zarazem najmniej poznaną interakcją pomiędzy mikroorganizmami jest z pewnością występowanie bakterii endosymbiontów, które przebywają w komórkach grzybów. Endosymbionty bakteryjne występują głównie w grzybach typu *Mucoromycota* i obejmują *Betaproteobacteria* (np. *Burkholderia*) i *Mollicutes* (np. *Mycoplasma*) [10, 15]. Mechanizmy, dzięki którym bakterie endogenne kolonizują swoich gospodarzy, zostały do tej pory opisane tylko kilkakrotnie. Okazuje się, że w tym przypadku kluczowe zadanie także odgrywają chitynazę. *Paraburkholderia rhizoxinica* aktywnie wydziela enzymy chitynolityczne za pomocą układu wydzielniczego typu II, aby przeniknąć strzępki grzyba, który jest gospodarzem *Rhizopus*

microsporus [63]. Jest to zarazem przykład trójstronnej interakcji niekorzystnej dla rośliny gdyż *B. rhizoxinica* i *R. microsporus* współdziałają, dzięki czemu są zdolne do wytwarzania i wydzielania rizoksyny, która jest silną fitotoksyną i czynnikiem wirulencji indukującym zarazę sadzonek ryżu [81]. Sugeruje się również złożoną trzypoziomową interakcję pomiędzy bakteriami zasiedlającymi gospodarza, którym jest grzyb mikoryzowy (AMF – Arbuscular Mycorrhizal Fungi), który z kolei kolonizuje rośliny. Pojawiające się wyniki pokazują, że pewne korzyści ze strony endobakterii jakie wynikają dla gospodarza grzybowego związanego z rośliną mogą rozprzestrzeniać się na samą roślinę [14]. Ewentualna rola chitynaz w tych procesach nie została jeszcze zbadana.

4. Praktyczne zastosowanie chitynaz

Ogromny potencjał chitynaz daje możliwości ich stosowania w wielu gałęziach przemysłu, m.in. rolnictwie, leśnictwie, produkcji żywności i medycynie. Ich udział w interakcjach między roślinami i mikroorganizmami oznacza, że mogłyby zostać z powodzeniem wykorzystane w rolnictwie do wspierania upraw oraz ochrony przed patogenami. Na przeszkodzie do praktycznego zastosowania chitynaz stoi jednak szereg problemów, a do najważniejszych należą, trudna optymalizacja i różnicowane spektrum działania.

Jednym z najważniejszych utrudnień jest złożona optymalizacja aktywności chitynaz, która wynika ze zróżnicowania ich cech, począwszy od obecności i lokalizacji wielu domen [45, 48], czy różnice w mechanizmach hydrolitycznych, w stosunku do natury wytworzonych produktów [37, 91]. Skutkuje to złożonością procesu optymalizacji produkcji chityny w tym doboru warunków jak pH czy temperatura, zastosowanie różnych źródeł węgla, dopasowanie specyficznego substratu i jego stężenia a także obecność induktorów i inhibitorów [25, 36, 58, 65]. Ponadto należy pamiętać o tym, że analiza i dopasowanie wydajności katalitycznej między zastosowaniami laboratoryjnymi i polowymi może być uciążliwa i może generować niespójne wyniki [66].

Konsekwencją różnic w budowie strukturalnej oraz mechanizmie działania jest zróżnicowanie aktywności antygrzybiczej przeciwko różnym grzybom, a nawet brak takiego działania wobec innych gatunków grzybów. W związku z tym nie możemy chitynaz rozpatrywać pod kątem ich uniwersalnego działania a raczej specyficznego dopasowania do konkretnych gatunków grzybów. Chitynaza izolowana ze *Streptomyces* sp. nie wykazywała żadnego działania przeciwko *Candida albicans*, natomiast znacznie hamowała wzrost testowanych grzybów strzępkowych jak *Colletotrichum gleosporoides*,

Penicillium expansum, *Pythium alphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* i *Penicillium chrysogenum*. Może to wskazywać na różnice pomiędzy aktywnością przeciwko grzybom strzępkowym i niestrzępkowym [36]. Chitynaza wyizolowana z jęczmienia, której działanie antygrzybicze sprawdzano przeciwko 15 gatunkom grzybów, hamowała tylko sześć z nich, tzn. *Bortyitis cinerea*, *Pythium theae*, *Bipolaris oryzae*, *Alternaria* sp., *Curvularia lunata* i *Rhizoctonia solani*, a pozostałe dziewięć w tym *Fusarium solani* i *Colletotrichum falcatum* już nie [40]. Takie zróżnicowanie pod względem skuteczności działania chitynaz wobec różnych patogenów grzybowych związane jest z różną kompozycją ściany komórkowej u poszczególnych gatunków grzybów [58].

Uważa się, że połączenie technologii i rekombinacji DNA pozwoli uzyskać bardziej efektywne i stabilne chitynazy do zastosowania podczas zwalczania chorób grzybowych roślin uprawnych. W ostatnich latach technologia rekombinacji DNA jest coraz częściej stosowana zarówno w stosunku do chitynaz bakteryjnych, jak i roślinnych, w celu zwiększenia aktywności enzymów i ich właściwości przeciugrzybiczych. Większość z nich jest nadal wytwarzana w homologicznych gospodarzach, jak np. chitynazy pochodzące z różnych szczepów należących do *Bacillus cereus* i wykazujące właściwości antygrzybicze w stosunku m.in. do *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria* spp. [30, 41, 51]. Wdrożono także kilka technik do konstruowania rekombinowanych chitynaz o zmienionej aktywności. Obejmują one ukierunkowaną mutagenezę, wprowadzenie małych delecji, ukierunkowaną ewolucję przez mutagenezę i wybór korzystnych cech, takich jak termostabilność, specyficzność substratu i parametry kinetyczne [66]. Największy wpływ na aktywność przeciugrzybiczą uzyskano przez zmianę układu CHBD, ponieważ domeny wiązania chityny odgrywają kluczową rolę w aktywności przeciugrzybiczej, pośrednicząc w wiązaniu enzymów do ściany komórkowej grzyba. W tym celu konstruuje się chitynazy chimeryczne, w których domenę wiązania chityny zastępuje się domeną z innego organizmu. Chitynaza z *Bacillus cereus* 28–9, gdzie CHBD zastąpiono ChiA1 z *Bacillus circulans* WL-12 wykazywała zwiększoną aktywność enzymatyczną i właściwości przeciwko *Botrytis elliptica* [34], a chimeryczna chitynaza z *Bacillus subtilis* i *B. pumilus* była skuteczna przeciwko *Rhizoctonia solani* i *Trichoderma harzianum* [75]. Co więcej, pojawiają się pierwsze doniesienia na temat wprowadzania konstruktów chimerycznych do roślin. Rzepak (*Brassica napus*) po transformacji dwoma genami kodującymi białka związane z patogenezą, tj. chimeryczną chitynazą z *Trichoderma atroviride* z domeną wiążącą chitynę pochodzącą z *Serratia marcescens* oraz białkiem podobnym do taumatyny z *Oryza sativa* uzyskał odporność na *Sclerotinia sclerotiorum* [2].

5. Podsumowanie

Rośliny oraz mikroorganizmy wykształciły wiele mechanizmów służących interakcji ze sobą nawzajem i ze środowiskiem. Wśród czynników biotycznych największy wpływ na wszystkie procesy życiowe, w tym na wzrost i rozwój roślin, mają mikroorganizmy. Określa się nawet, że stanowią one drugi genom rośliny. Aby możliwe były interakcje między roślinami a mikroorganizmami konieczna jest wymiana związków sygnałowych, do których należą chitynazy. Okazuje się, że również chitynazy bakteryjne mogą odgrywać w tych relacjach znaczącą rolę. Ponadto chitynazy roślinne oraz bakteryjne mogą w sposób bezpośredni regulować liczbę drobnoustrojów, w szczególności grzybów, wśród których znajdują się fitopatogeny. Szczególnie istotne są interakcje bakteryjno-grzybowe, które mogą wносить wyjątkowy wkład w cykle biogeochemiczne oraz procesy biotechnologiczne. Pomimo wielu trudności z optymalizacją działania w ostatnich latach opracowano wiele przemysłowych i medycznych zastosowań chityny i jej pochodnych i nadal rośnie zainteresowanie enzymami chitynolitycznymi. Z powodzeniem chitynazy i produkty ich działania mogą być wykorzystywane w rolnictwie, leśnictwie, produkcji żywności i medycynie.

Piśmiennictwo

1. Adrangi S., Faramarzi M.A.: From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotech. Adv.* **31**, 1786–1795 (2013)
2. Aghazadeh R., Zamani M.R., Motallebi M., Moradyar M., Moghadassi Jahromi Z. Co-transformation of canola by chimeric chitinase and tlp genes towards improving resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 144–155 (2016)
3. Arora N.K., Kim M.J., Kang S.C., Maheshwari D.K.: Role of chitinase and β -1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and in vitro inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* **53**, 207–212 (2007)
4. Bai Y., Eijsink V.G.H., Kielak A.M., van Veen J.A., de Boer W.: Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria. *Environ. Microbiol.* **18**, 38–49 (2016)
5. Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N.: Plant beta-1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1983–1990 (2012)
6. Barile E., Bonanomi G., Antignani V., Zolfaghari B., Sajjadi S.E., Scala F., Lanzotti V.: Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochem.* **68**, 596–603 (2007)
7. Balzergue C., Puech-Pagès V., Bécard G., Rochange S.F.: The regulation of arbuscularmycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J. Exp. Bot.* **62**, 1049–1060 (2011)
8. Bhattacharyya P.N., Jha D.K.: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1327–1350 (2012)

9. Bonanomi A., Wiemken A., Boller T., Salzer P.: Local induction of a mycorrhiza specific class III chitinase gene in cortical root cells of *Medicago truncatula* containing developing or mature arbuscules. *Plant Biol.* **3**, 194–199 (2001)
10. Bonfante P., Desirò A.: Who lives in a fungus? The diversity, origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. *ISME J.* **11**, 1727–1735 (2017)
11. Brzezinska M.S., Jankiewicz U., Walczak M.: Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **84**, 104–110 (2013)
12. Cai J., Staehelin C. i wsp.: Role of the Nod Factor Hydrolase MtNFH1 in Regulating Nod Factor Levels during Rhizobial Infection and in Mature Nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, **30**, 397–414 (2018)
13. Chibeba A.M., Kyei-Boahen S., Guimarães M.F., Nogueira M.A., Hungria M.: Isolation, characterization and selection of indigenous Bradyrhizobium strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agri. Eco. Environ.* **246**, 291–305 (2017)
14. Desirò A., Faccio A., Kaech A., Bidartondo M.I., Bonfante P.: Endogone, one of the oldest plant-associated fungi, host unique Mollicutes-related endobacteria. *New Phytol.* **205**, 1464–1472 (2015)
15. Deveau A., Bonito G., Uehling J., Paoletti M., Becker M., Bindschedler S., Hacquard S., Hervé V., Labbé J., Lastovetsky O.: Bacterial-fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 335–352 (2018)
16. Dowd P.F., Naumann T.A., Price N.P.J., Johnson E.T.: Identification of a maize (*Zea mays*) chitinase allele sequence suitable for a role in ear rot fungal resistance. *Agri. Gene*, **7**, 15–22 (2018)
17. Do Amaral D.O.J., De Almeida C.M.A., Correia M.T.D.S., De Menezes Lima V.L., Da Silva M.V.: Isolation and Characterization of Chitinase from Tomato Infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Phytopathol.* **160**, 741–744 (2012)
18. Elfstrand M., Feddermann N., Ineichen K., Nagaraj V.J., 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.* **167**, 557–570 (2005)
19. 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*, **16**, 219–223 (2006)
20. Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., Sarniguet A.: Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 583–609 (2011)
21. Fürstenberg-Hägg J., Zagobelny M., Bak S.: Plant defense against insect herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 10242–10297 (2013)
22. Garg N., Gupta H.: Isolation and purification of fungal pathogen (*Macrophomina phaseolina*) induced chitinase from moth beans (*Phaseolus aconitifolius*). *J. Phar. Bioall. Sci.* **2**, 38–43 (2010)
23. Ghani A.: Toxic effects of heavy metals on plant growth and metal accumulation in maize (*Zea mays* L.). *Ir. J. Toxicol.* **3**, 325–334 (2011)
24. Gherbawy Y., Elhariry H., Altalhi A., El-Deeb B., Khiralla G.: Molecular screening of *Streptomyces* isolates for antifungal activity and family 19 chitinase enzymes. *J. Microbiol.* **50**, 459–468 (2012)
25. Gomaa E.Z.: Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* **50**, 103–111 (2012)
26. Gonzalez-Franco A.C., Deobald L.A., Spivak A., Crawford D.L.: Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non-rhizosphere isolates. *Can. J. Microbiol.* **49**, 683–698 (2003)
27. Grayer R.J., Kokubun T.: Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochem.* **56**, 253–263 (2001)
28. Gupta P., Ravi I., Sharma V.: Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *J. Plant Inter.* **8**, 155–161 (2013)
29. Gupta R., Deswal R.: Refolding of β -stranded class I chitinases of *Hippophae rhamnoides* enhances the antifreeze activity during cold acclimation. *PLoS One*, **9**, e91723 (2014)
30. Hammami I., Siala R., Jridi M., Ktari N., Nasri M., Mohamedali T.: Partial purification and characterization of chiIO8, a novel antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* IO8. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 358–366 (2013)
31. Hartl L., Zach S., Seidl-Seiboth V.: Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 533–543 (2012)
32. Hayashi M., Saeki Y., Haga M., Harada K., Kouchi H., Umehara Y.: Rj (rj) genes involved in nitro gen-fixing root nodule formation in soybean. *Breeding Sci.* **61**, 544–553 (2012)
33. Hernández-León R., Rojas-Solis D., Contreras-Pérez M., del Carmen Orozco-Mosqueda M., Macías-Rodríguez L.I., Reyes-de la Cruz H., Valencia-Cantero E., Santoyo G.: Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control.* **81**, 83–92 (2015)
34. Huang C.J., Guo S.H., Chung S.C., Lin Y.J., Chen C.Y.: Analysis of the involvement of chitin-binding domain of ChiCW in antifungal activity, and engineering a novel chimeric chitinase with high enzyme and antifungal activities. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1169–1175 (2009)
35. Iqbal M., Nazir F., Ali S., Asif M. A., Zafar Y., Iqbal J., Ali G.M.: Overexpression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot. *Mol. Biotechnol.* **50**, 129–136 (2012)
36. Karthik N., Binod P. and Pandey A.: Purification and characterization of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. *Bioresour. Technol.* **188**, 195–201 (2015)
37. Kawase T., Yokokawa S., Saito A., Fujii T., Nikaidou N., Miyashita K., Watanabe T.: Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 988–998 (2006)
38. Khan A., Nasir I.A., Tabassum B., Aaliya K., Tariq M., Rao A.Q.: Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani*. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* **128**, 563–576 (2017)
39. Kieffer P., Dommes J., Hoffmann L., Hausman J.F., Renaut J.: Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*, **8**, 2514–2530 (2008)
40. Kirubakaran S.I., Sakthivel N.: Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **52**, 159–166 (2007)
41. Kishore G.K., Pande S.: Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of *Botrytis gray* mold disease in chickpea under controlled conditions. *Let. Appl. Microbiol.* **44**, 98–105 (2007)
42. Kisiel A., Jęckowska K., Kępczyńska E.: Rola chitynaz w rozwoju roślin. *Post. Biol. Kom.* **43**, 283–287 (2016)
43. Kisiel A., Kępczyńska E.: Chitynazy bakteryjne i ich wykorzystanie w biotechnologii. *Post. Mikrobiol.* **56** (3), 306–315 (2017)

44. 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 insecticidal activity. *BMC Biochem.* DOI: 10.1186/1471-2091-11-6 (2010)
45. Kezuka Y., Ohishi M., Itoh Y., Watanabe J., Mitsutomi M., Watanabe T., Nonaka T.: Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Mol. Biol.* **358**, 472–484 (2006)
46. Kopperapu N.K., Liu Z., Fei F., Yan Q., Jiang Z.: Purification and characterization of a chitinase (sAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*. *Proc. Biochem.* **46**, 1370–1374 (2011)
47. Kumar K., Ran R.M.: Chitinase production by rhizobacterial strains isolated from root nodules of *Vigna trilobata* cultivars. *IJASR*, **6**, 85–92 (2016)
48. Landim P.G.C., Grangeiro T.B. i wsp.: Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. *Biochimie*, **135**, 89–103 (2017)
49. Larsen T., Petersen B.O., Storgaard B.G., Duus J.O., Palcic M.M., Leisner J.J.: Characterization of a novel *Salmonella typhimurium* chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetyllactosamine conjugate. *Glycobiology*, **21**, 426–436 (2011)
50. Li H.Y., Yang G.D., Shu H.R., Yang Y.T., Ye B.X., Nishida I., Zheng C.C.: Colonization by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus versiforme* Induces a Defense Response Against the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* in the Grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), Which Includes Transcriptional Activation of the Class III Chitinase Gene VCH3. *Plant Cell Physiol.* **47**, 154–163 (2006)
51. Li J.G., Jiang Z.Q., Xu L.P., Sun F.F., Guo J.H. Characterization of chitinases secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. *BioControl*, **53**, 931–944 (2008)
52. Lim H.-S., Kim Y.-S., Kim S.-D., *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 510–516 (1991)
53. Liu D., Cai J., Xie Ch.-Ch., Liu Ch., Chen Y.-H.: Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* spp. colmeri, and its biocontrol potential. *Enzyme Microb. Technol.* **46**, 252–256 (2010)
54. Lugtenberg B., Kamilova F.: Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **63**, 541–556 (2009)
55. Major I.T., Constabel C.P.: Molecular analysis of poplar defense against herbivory. Comparison of wound – and insect elicitor-induced gene expression. *New Phytol.* **172**, 617–635 (2006)
56. Marzec M., Szarejko I., Melzer M.: Arabinogalactan proteins are involved in root hair development in barley. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/eru47 (2014)
57. Massey F.P., Hartley S.E.: Physical defences wear you down: progressive and irreversible impacts of silica on insect herbivores. *J. Anim. Ecol.* **78**, 281–291 (2009)
58. Matroodi S., Motallebi M. Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1517–1523 (2013)
59. Menna P., Hungria M., Barcellos F.G., Bangel E.V., Hess P.N., Martinez-Romero E.: Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 315–332 (2006)
60. Mészáros P., Rybanský L., Hauptvogel P., Kuna R., Libantová J., Moravčíková J., Piršelová B., Tirpáková A., Matušíková I. Cultivar-specific kinetics of chitinase induction in soybean roots during exposure to arsenic. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 2127–2138 (2013)
61. Mészáros P., Rybanský L., 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 specificity. *Plant Cell Rep.* **33**, 1789–1799 (2014)
62. 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.* **143**, 487–495 (2008)
63. Moebius N., Üzümlü Z., Dijksterhuis J.: Active invasion of bacteria into living fungal cells. *Elife* **3**, 10.7554/eLife.03007 (2014)
64. Nagpure A., Gupta R.K.: Purification and characterization of an extracellular chitinase from antagonistic *Streptomyces violaceusniger*. *J. Basic Microbiol.* **52**, 1–11 (2013)
65. Nawani N.N., Kapadnis B.P.: Production dynamics and characterization of chitinolytic system of *Streptomyces* sp. NK 1057, a well equipped chitin degrader. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 487–494 (2004)
66. Neeraja C., Anil K., Podile A.R. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 231–241 (2010)
67. Negi Y. K., Prabha D., Garg S. K., Kumar J. Biological control of ragi blast disease by chitinase producing fluorescent *Pseudomonas* isolates. *Org. Agric.* **7**, 63–71 (2015)
68. Ohno M., Togashi Y., Tsuda K., Okawa K., Kamaya M., Sakaguchi M., Sugahara Y., Oyama F.: Quantification of Chitinase mRNA Levels in Human and Mouse Tissues by Real-Time PCR: Species-Specific Expression of Acidic Mammalian Chitinase in Stomach Tissues. *PLoS One*, **8**, e67399 (2013)
69. Ohnuma T., Numata T., Osawa T., Mizuhara M., Lampela O., Juffer A.H., Skriver K., Fukamizo T. A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*, **234**, 123–137 (2011)
70. Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O.: Mechanisms of actions of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 197 (2017)
71. Oldroyd G.E., Downie J.A.: Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Ann. Rev. Plant Biol.* **59**, 519–546 (2008)
72. Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macias-Rodriguez L., López-Bucio J.: The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* **4**, 701–712 (2009)
73. Patel A.K., Singh V.K., Yadav R.P., Moir A.J.G., Jagannadham M.V.: Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Proc. Biochem.* **45**, 675–681 (2010)
74. Prasad K., Bhatnagar-Mathur P., Waliyar F., Sharma K.K.: Overexpression of a chitinase gene in transgenic peanut confers enhanced resistance to major soil borne and foliar fungal pathogens. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **22**, 222–233 (2013)
75. Rostami A., Hinc K., Goshadrou F., Shali A., Bayat M., Hassanzadeh M., Amanlou M., Eslahi N., Ahmadian G.: Display of *B. pumilus* chitinase on the surface of *B. subtilis* spore as a potential biopesticide. *Pestic. Biochem. Physiol.* **140**, 17–23 (2017)
76. Salazar S., Castagnaro A., Arias M., Chalfoun N., Tonello U., Díaz Ricci J.: Induction of a defense response in strawberry mediated by an avirulent strain of *Colletotrichum*. *Eur. J. Plant Pathol.* **117**, 109–122 (2007)
77. Salzer P., Boller T.: Elicitor-induced reactions in mycorrhizae and their suppression (w) Current advances in mycorrhizae research, red. G.K. Podila, D.D. Douds, Minnesota, USA, The American Phytopathological Society, s. 1–10
78. Salzer P., Bonanomi A., Beyer K., Vögeli-Lange R., Aeschbacher R.A., Lange J., Wiemken A., Kim D., Cook D.R., Boller T.:

- Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *MPMI*, **13**, 763–777 (2000)
79. Salzer P., Feddermann N., Wiemken A., Boller T., Staehelin C.: Sinorhizobium meliloti – induced chitinase gene expression in *Medicago truncatula* ecotype R108-1: a comparison between symbiosis-specific class V and defence related class IV chitinases. *Planta*, **219**, 626–638 (2004)
 80. Santos P., Fortunato A., Ribeiro A., Pawlowski K.: Chitinases in root nodules. *Plant Biotechnol.* **25**, 299–307 (2008)
 81. Scherlach K., Busch B., Lackner G., Paszkowski U., Hertweck C.: Symbiotic cooperation in the biosynthesis of a phytotoxin. *Angewandte Chemie*, **51**, 9615–9618 (2012)
 82. Sekar J., Raju K., Duraisamy P., Vaiyapuri P.R. Potential of finger millet indigenous rhizobacterium *Pseudomonas* sp. MSSRFD41 in blast disease management—growth promotion and compatibility with the resident rhizomicrobiome. *Front Microbiol.* **9**, 1029 (2018)
 83. Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K.: Role of chitinase in plant defense. *Asian J. Biochem.* **6**, 29–37 (2011)
 84. Shores M., Harman G.E.: 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.* **10**, 136 (2010)
 85. Showalter A.M.: Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1399–1417 (2001)
 86. Singh H.R., Deka M., Das S.: Enhanced resistance to blister blight in transgenic tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) by overexpression of class I chitinase gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Funct. Integr. Genomics*, **15**, 461–80 (2015)
 87. Sinha M., Singh R.P., Kushwa G.S., Iqbal N., Singh A., Kaushik S., Kaur P., Sharma S., Singh T.P.: Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *Sci. World J.* doi.org/10.1155/2014/543195 (2014)
 88. Sridevi M., Mallaiiah K.V.: Factors effecting chitinase activity of *Rhizobium* sp. from *Sesbania sesban*. *Biologia*, **63**, 307–312 (2008)
 89. Someya N., Nakajima M., Hirayae K., Hibi T., Akutsu K.: Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2 against the gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant. Pathol.* **67**, 312–317 (2001)
 90. 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.* **15**, 2738–2760 (2014)
 91. Suzuki K., Sugawara N., Suzuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N., Watanabe T.: Chitinases, A, B and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *E. coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1075–1083 (2002)
 92. Tian Y., Liu W., Cai J., Zhang L.Y., Wong K.B., Feddermann N., Boller T., Xie Z.P., Staehelin C.: The nodulation factor hydrolase of *Medicago truncatula*: characterization of an enzyme specifically cleaving rhizobial nodulation signals. *Plant Physiol.* **163**, 1179–1190 (2013)
 93. Toufiq N., Tabassum B., Bhatti M.U., Khan A., Tariq M., Shahid N., Nasir I.A., Husnain T.: Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. *Braz. J. Microbiol.* **49**, 414–421 (2018)
 94. Tsujibo H., Kubota T., Yamamoto M., Miyamoto K., Inamor Y.: Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardopsis prasina* OPC-131. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 894–900 (2003)
 95. Vega K., Kalkum M.: Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *Int. J. Microbiol.* 2012, doi: 10.1155/2012/920459 (2012)
 96. Veliz E.A., Martínez-Hidalgo P., Hirsch A.M.: Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiol.* **3**, 689–705 (2017)
 97. Wan J., Zhang X.-C., Neece D., Ramonell K.M., Clough S., Kim S.-Y., Stacey M.G., Stacey G.: A LysM receptor-like kinase plays critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 471–481 (2008)
 98. Wang S., Shao B., Fu H., Rao P.: Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 313–321 (2009)
 99. Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A.: Toxic effects of heavy metals on germination and physiological processes of plants. (w) Toxicity of Metals to Legumes and Bioremediation red. Zaidi A., Wani P.A., Khan M.S. Springer-Verlag Wien, 2012, s. 45–66.
 100. Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D., Coghill J.A., Edwards K.J.: Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 749–771 (2010)
 101. Xu J., Xu X., Tian L., Wang G., Zhang X., Wang X., Guo W.: Discovery and identification of candidate genes from the chitinase gene family for *Verticillium dahliae* resistance in cotton. *Sci. Rep.* **6**, 29022; doi: 10.1038/srep29022 (2016)
 102. Yeh S., Lajoie G. i wsp.: Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol.* **124**, 1251–1263 (2000)
 103. Zarandi H.S., Bagheri A., Baghizadeh A., Moshtaghi N.: Quantitative analysis of chitinase gene expression in chickpea. *Russ. J. Plant Physiol.* **58**, 681–685 (2011)
 104. Zarei M., Aminzadeh S., Zolgharnein H., Safahieh A., Daliri M., Noghbi K.A., Motallebi A. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Braz. J. Microbiol.*, **42**, 1017–1029 (2011)
 105. Zhang J., Zhang X., Arakane Y., Muthukrishnan S., Kramer K.J., Ma E., Zhu K.Y.: Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PLoS One* e0019899 (2011a)
 106. Zhang L.-Y., Cai J., Li R.-J., Liu W., Wagner C., Wong K.-B., Xie Z.-P., Staehelin C.: A single amino acid substitution in a chitinase of the legume *Medicago truncatula* is sufficient to gain Nod-factor hydrolase activity. *Open Biol.* **6**, 160061 (2016)
 107. Zhang S.-H., Wei Y., Liu J.-L., Yu H.-M., Yin J.-H., Pan H.-Y., Baldwin T.C.: An apoplastic chitinase CpCMT1 isolated from the corolla of wintersweet exhibits both antifreeze and antifungal activities. *Biol. Plant.* **55**, 141–148 (2011b)
 108. Zhao M., Ma Y., Pan Y.H., Zhang C.H., Yuan W.X.: A hevein-like protein and a class I chitinase with antifungal activity from leaves of the paper mulberry. *Biomed Chromatogr.* **25**, 908–912 (2011)
 109. Zubek S., Błaszowski J., Mleczko P.: Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte associations of medicinal plants. *Acta. Soc. Bot. Pol.* **80**, 285–292 (2011)