

## Bitki Kitinazları: Moleküler Yapıları, Önemleri ve Kullanımları

Muhip HİLOOĞLU

**ÖZET:** Kitinaz proteinleri biyolojik sistemlerde doğada yaygın şekilde bulunurlar. Bitki kitinazları, glikozid hidrolaz gen ailesinden GH18 ve GH19 aileleri içerisinde yer almaktadır. Yedi sınıfa (I-VII) ayrılan bitki kitinazları, yapıları, amino asit dizi benzerlikleri, substrat spesifiteleri, kataliz mekanizmaları ve inhibitör hassasiyetlerine göre birbirlerinden farklılaşırlar. GH19 ailesinde bulunan sınıf I, II, IV, VI ve VII kitinazlarının en önemlileri patojen bağlantılı proteinlerden oluşmaktadır. Genel olarak bitki kitinazları patojenlere ve abiyotik faktörlere yanıt olarak bitkiler tarafından üretilirler. Bunlar, bitkilerde antifungal, antibakteriyel, insektisidal, nematisidal ve antiviral savunma mekanizmaları geliştirirler. Kitinazlar, gen mühendisliği uygulamaları aracılığıyla ticari öneme sahip bitkilere aktarılmaktadır. Böylece, biyotik ve abiyotik etkilere karşı dirençli bitkiler geliştirilmektedir. Bu derlemede, bitki kitinazlarının özellikleri, önemleri ve kullanımları hakkında bilgiler verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kitinazlar, bitki savunma, patojen, genetik mühendislik

## Plant Chitinases: Molecular Structure, Importance and Utilizations

**ABSTRACT:** Chitinase proteins are extensively distributed throughout various biological systems. Plant chitinases are found in the GH18 and GH19 families of the glycoside hydrolase gene family. Based on structure, substrate specificity, amino acid sequence similarity, mechanisms of catalysis and sensitivity to inhibitors, plant chitinases are classified into seven classes (I-VII). The most important chitinases are pathogenesis-related proteins which class I, II, IV, VI and VII are found in the GH19 family. In general, plant chitinases are produced by plants as an answer to pathogens and abiotic factors. They develop antifungal, antibacterial, insecticidal, nematocidal, and antiviral defence mechanisms in plants. Chitinases are transferred into commercially important plants via gene engineering applications. In this way, resistant transgenic plants are being developed counter to biotic and abiotic effects. In this review is giving information about the properties, importance and applications of plant chitinases.

**Keywords:** Chitinases, plant defense, pathogen, genetic engineering

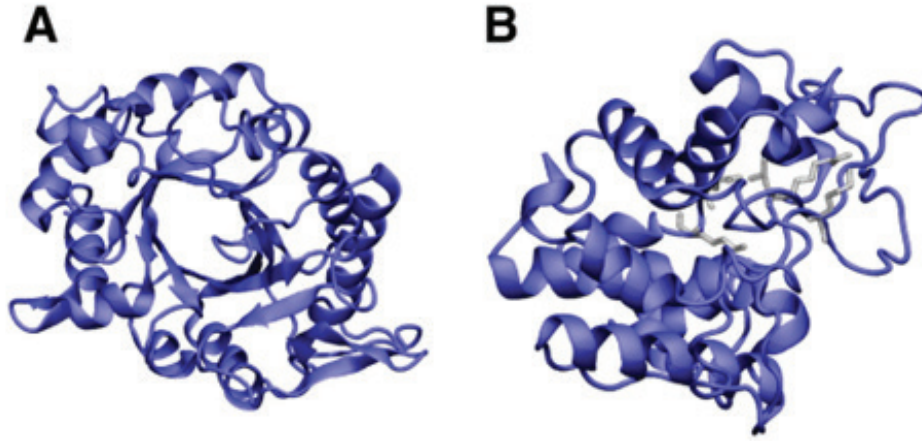


<sup>1</sup> Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye  
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Muhip HİLOOĞLU, mhilooglu@anadolu.edu.tr

## GİRİŞ

Glikozid hidrolaz (GH) gen ailesi, enzimlerin altı sınıfından üçüncüsü olan hidrolazlara dahildir. İki ya da daha fazla karbonhidrat arasındaki veya karbonhidrat ve karbonhidrat olmayan parçalar arasındaki glikozidik bağları hidrolize ederler (Cantarel et al., 2009). GH aileleri amino asit dizilerinin benzerliklerine göre sınıflandırılırlar. Çünkü amino asit dizileri ve katlama benzerlikleri arasında doğrudan bir ilişki vardır. CAZy veritabanına göre GH'ların sınıflandırılmış 135 ailesi vardır (<http://www.cazy.org/>

Glycoside-Hydrolases.html). Kitinaz (EC 3.2.1.14) bu 135 aileden 18. (GH18) ve 19. (GH19) ailelere dahildir. İki aile amino asit dizilerine, üç boyutlu yapılarına ve katalitik reaksiyonlarının moleküler mekanizmasına göre farklılaşırlar (Mizuno et al., 2008). GH18 kitinazlarının katalitik bölgeleri ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> TIM-barrel katlanmasına sahip olup bir substrat destekli tutma mekanizmasında görev alır. GH19 kitinazların katalitik bölgeleri ise büyük ölçüde  $\alpha$ -heliks yapısı göstererek tek bir değişim çevirici mekanizması kullanır (Suginta et al., 2016) (Şekil 1).



**Şekil 1.** GH enzimlerinin 3 boyutlu yapıları A) *Aspergillus fumigatus*'tan ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel yapısında GH18 kitinazı B) *Carica papaya*'dan  $\alpha+\beta$  yapıdaki bir GH19 kitinazı (Adrangi and Faramarzi, 2013)

GH18 ailesi kitinazlarının katalitik mekanizması, ürünlerin anomerik konfigürasyonlarını taşıyan substrata dayalı katalizi içerir. Bu aile esas olarak allosaminidin tarafından inhibe edilir. GH19 ailesi kitinazlarının katalitik mekanizması ise, hidrolize poli- $\beta$ -(1,4)-N-asetilglukozamin (NAG) kalıntısının anomerik konfigürasyonunu tersine çeviren genel bir asid-baz mekanizmasıdır. GH19 ailesi kitinazların inhibitörleri amidinler ve amidrazonlardır (Kasprzewska et al., 2003; Karthik et al., 2017). Farklı organizmalardaki kitinazlar bu moleküler yapıları temelinde ve fizikokimyasal özelliklerine göre ayırt edilirler (Bhattacharje et al., 2017). GH18 ailesi kitinazları bakterilerde, funguslarda, virüslerde, hayvanlarda ve yüksek yapılı bitkilerde bulunurlar. GH19 ailesi kitinazlar ise yüksek yapılı bitkiler ve bazı bakterilerde bulunurlar.

## Bitki Kitinazları

Kitinaz ilk olarak 1911 yılında Bernard tarafından orkide soğanlarında, termosensör görevi ve antifungal ajan olarak bulunmuştur. Bu enzim bitki bulunduğu tarihten itibaren bağışıklık cevabını güçlendirmede bir araç olarak kullanılmaktadır (Sharma et al., 2011). Bitki kitinazları; yapıları, substrat spesifiteleri, kataliz mekanizmaları ve inhibitör hassasiyetleri temelinde, GH18 ve GH19 aileleri içinde toplam 7 sınıf (I-VII) altında bulunmaktadırlar (Arie et al., 2000; Sarma et al., 2012). Sınıf I, II, IV, VI ve VII GH19 ailesinde; Sınıf III ve V ise GH18 ailesinin üyeleridir. (Adrangi and Faramarzi, 2013). Xu et al. (2007) Sınıf I'i Ia ve Ib olarak ikiye ayırmışlardır. Sınıf Ia kitinazlar asidiktir ve vakuolde bulunan yaklaşık 6 amino asitlik bir C-terminal bölgesine (ChBD) sahiptir. Sınıf Ib kitinazlar ise basittir, ChBD içermezler ve apoplastta

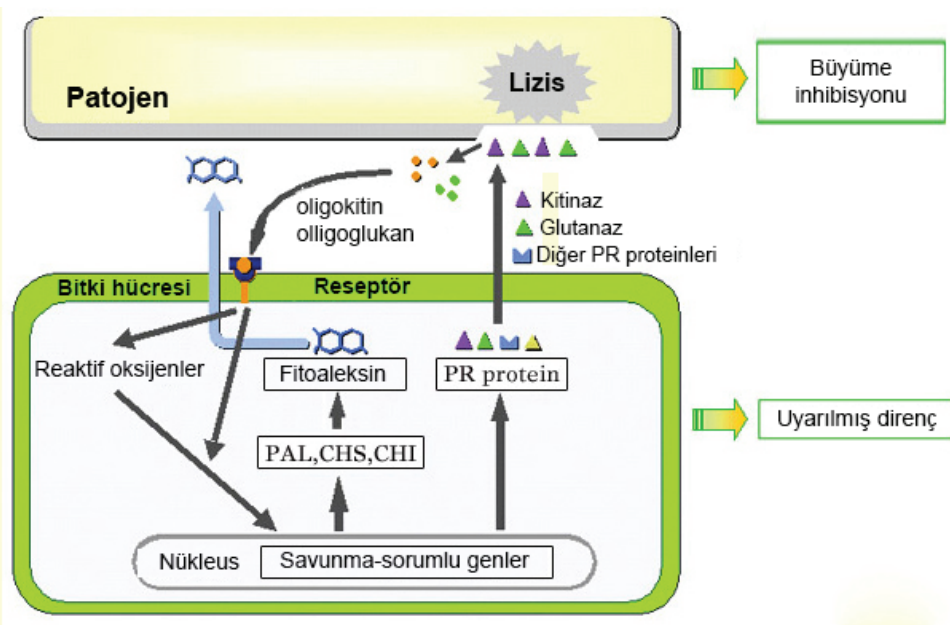
gizlenmiş şekilde bitkilerde bulunurlar (Ouyang et al., 2001; Xu et al., 2007). Sınıf II kitinazlarda yalnızca katalitik bölge bulunurken, sınıf I ve IV ise N-terminal sistein zengin kitin bağlanma bölgesi ve 10-20 kalıntı uzunluğundaki peptide bağlı C-terminal katalitik bölgesi (CatD) içerirler. Sınıf IV kitinazlarını sınıf I'den ayıran en önemli özellik katalitik bölgedeki karakteristik delesyonlardır (Mizuno et al., 2008). Bunlar, patojen yüzeyine yakın glikozidik bağın hidrolizi ile sonuçlanan kitin bağlayıcı bölgedeki üç adet delesyondur. Sınıf IV, asidik kitinazlar olup bağlayıcı bir bölge oluşturmazlar. Bunlar, hem sınıf II'ye hem de sınıf I'e çok daha az dizi benzerliği göstermektedirler (Porat et al., 2001). GH19 ailesinin 3 boyutlu yapısı ilk olarak Hart et al. (1996) tarafından arpa bitkisinden Sınıf II kitinazıyla rapor edilmiştir. Bu çalışmadan sonra fasulye bitkisinde de yapısı ortaya konmuştur (Hahn et al., 2000).

GH18 ailelerinin üyesi olan sınıf III ve V kitinazları ise daha uzak akrabalık ilişkisi gösterirler (Mizuno et al., 2008). Sınıf V'in tek temsilcisi *Utrica doica*'dan [ısırgan otu, (Utricaceae)] rapor edilmiştir. Bu sınıf, kitin bağlayıcı bölgelerle kitinaz homolojisine sahip olan bir lektindir. Sınıf V'te kitin bağlayıcı bölgedeki katalitik kalıntılar delesyona uğradığından herhangi bir katalitik aktiviteye sahip değildirler (Velezhan et al., 2000). Patojen bağımlı (PR) proteinlerden PR-3 sınıfında değerlendirilen kitinazlardan (sınıf I, II, IV, V, VI ve VII) farklı olarak sınıf III kitinazlar

PR-8 sınıfının içerisinde bulunmaktadır. Ek olarak, lizozim fonksiyonları da vardır. Sekans benzerliği ve substrat spesifitesi bakımından farklılık gösterirler. Tütün, nohut, salatalık ve arabidopsis bitkilerinde karakterizasyonu yapılan sınıf III'ün hem bazik hem de asidik formları bulunur (Van Loon, 1999; Neuhaus, 1999). Sınıf III kitinazların en bilineni; bir endo-kitinaz olan hevamindir. *Hevea brasiliensis*'nin (kauçuk ağacı) lateksinde bulunan vakuollerden izole edilmiş olan hevamin 29 kilodalton (kDa) büyüklüğüyle önemli oranda hayvan ve faj lizozimlerinden (14-21 kDa) farklılık göstermektedir (Scheltinga et al., 1994). Ancak bitki kitinazları genellikle böceklerde mevcut olan kitinazlardan daha düşük molekül ağırlığına sahip endo-kitinazlardır. Boyutları genellikle 25-40 kDa arasında değişir (Bhattacharya et al., 2007).

### Patojen bağımlı proteinler ve önemleri

Bitkiler için oldukça özelleşmiş GH19 aile üyesi olan bitki kitinazları patojen bağımlı (PR) proteinlerin içinde kategorize edilip bunların önemli bir bölümünü içerir (Xayphakatsa et al., 2008). Yüksek yapılı bitkiler çeşitli patojenler tarafından gerçekleştirilen, biyokimyasal ve fizyolojik değişimlere neden olan saldırılara karşı geniş bir savunma mekanizması oluşturur. Bunlardan en önemlileri fitoaleksinin üretimi ve PR proteinlerinin sentezi ( $\beta$ -1,3-Glukanazlar ve kitinazlar gibi) olup farklı proteinleri kodlayan bir dizi genin aktivasyonuna yol açarlar (Sharma, 2013) (Şekil 2).



Şekil 2. Kitinazların bitki savunmasında patojenlere karşı rolü (Nishizawa, 2005)

Bu proteinler, kitinazlardan meydana gelen PR-3, PR-4, PR-8 ve PR-11'in de içinde olduğu 17 aile içerisinde sınıflandırılır (Sels et al., 2008). PR proteinlerinin 17 ailesinin özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir.

**Çizelge 1.** Patojen bağıntılı (PR) proteinlerin sınıflandırılması

Aile	Tip üyesi	Özellikleri	Kaynak
PR-1	Tütün PR-1a	Antifungal	Antoniw et al., 1980
PR-2	Tütün PR-2	$\beta$ -1,3-glukanaz	Antoniw et al., 1980
PR-3	Tütün P, Q	Kitinaz tip I,II, IV,V,VI,VII	Van Loon, 1982
PR-4	Tütün 'R'	Kitinaz tip I,II	Van Loon, 1982
PR-5	Tütün S	Taumatın- benzeri	Van Loon, 1982
PR-6	Domates İnhibitor I	Proteinaz- inhibitör	Green and Ryan, 1972
PR-7	Domates P69	Endoproteinaz	Vera and Conejero, 1988
PR-8	Salatalık kitinaz	Kitinaz tip III	Metraux et al., 1988
PR-9	Tütün 'lignin forming peroxidase'	Peroksidaz	Lagrimini et al., 1987
PR-10	Maydanoz 'PR1'	Ribonükleaz benzeri	Somssich et al., 1986
PR-11	Tütün 'class V' kitinaz	Kitinaz, tip I	Melchers et al., 1994
PR-12	Turp Rs- AFP3	Defensin	Terras et al., 1995
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Tiyonin	Epple et al., 1995
PR-14	Arpa LTP4	Lipid- transfer protein	Garcia-Olmeda et al., 1995
PR-15	Arpa OxOa (germin)	Oksalat oksidaz	Zhang et al., 1995
PR-16	Arpa OxOLP	Oksalat oksidaz-benzeri	Wei et al., 1998
PR-17	Tütün PRp27	Bilinmiyor	Okushima et al., 2000

PR proteinleri, hidrolitik enzimler, enzim inhibitörleri ve membran-geçirgen peptidler de dahil işgalci patojenlere ve abiyotik faktörlere yanıt olarak bitkiler tarafından üretilen bir grup proteindir (Li and Yi, 2012; Adrangi and Faramarzi, 2013). Ek olarak, PR proteinleri antifungal, antibakteriyel, insektisidal, nematisidal ve antiviral etki gösterirler. Dolayısıyla, PR proteinleri bitkilerde patojenlere karşı geniş bir "sistemik kazanılmış direnç" (Systematic Acquired Resistance/SAR) mekanizmasına dahil olurlar.

#### **Bitki kitinazlarının fonksiyonel yönleri**

Kitin doğada karbonhidrat ve proteinler ile kompleks olarak bulunur (Sietsma and Wessels, 1979). Ek olarak, yağlarla, pigmentlerle ve minerallerle

(kalsiyum karbonat gibi) kompleks oluşturabilir (Synowiecki and Al-Khateeb, 2003). Kitin bir poli- $\beta$ -(1,4)-N-asetilglukozamin olup doğada selülozdan sonra en fazla bulunan polisakkarit türüdür (Khoushab and Yamabhai, 2010). Doğada yaygın olarak bulunan kitinin mantarların hücre duvarlarının yapısında, eklem bacaklıların üst deri ve kabuklarında, nematodlarda, yumuşakçalarda ve bazı alglerde bulunduğu bildirilmiştir (Li et al., 2016). Çeşitli canlıların yumurtalarının kabuğunda da kitin varlığı bilinmektedir (Farnesi et al., 2015; Ju et al., 2016). Bu ve benzeri organizmalar bitkilere direkt zararlarının yanında dolaylı olarak viral, fungal ya da bakteriyel etmenleri taşıyabilen özelliklere sahiptirler. Kitinaz, kitinin doğrusal bir  $\beta$  1-4 bağlı homopolimer olan

N-asetilglukozamin'in (GlcNAc) endo veya ekzo yıkımından sorumludur. (Sietsma and Wessels, 1979). Şimdiye kadar, kitinazlar bitkinin bütün organ ve dokularında (tohumlar, kökler, yumrular, meyve ve çiçek) bulunmuşlardır (Nauman et al., 2013; Zhang et al., 2013). Bunlara apoplast ve vakuoller de dahildir. Bu kitinazlar bitki savunmasında patojenlere karşı çeşitli şekillerde (aktif veya pasif savunmada) kullanılabilir (Xu et al., 2007). Enzim, serbest veya immobilize formda kullanılabilirdiği gibi kitinaz üreten mikroorganizmaların toprağa verilmesi yoluyla da kullanılabilir. (Sharma et al., 2011). Bununla birlikte, kitinaz kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı düşük maliyet ve kolaylıktan dolayı yaygındır. Burada, kitin yıkımı topraktaki azot döngüsü için önem taşır. Doğal kitinaz kaynağı olan *Serratia marcescens*, *Xanthomonas maltophilia* gibi bakteriler potansiyel üreticiler iken *Myrothecium verrucaria* ana kaynak olarak görülmektedir (Gowindsamy et al., 1998). Fakat, tek başlarına mikroorganizma kitinazları yetersiz kalmakta olup bitki kitinazları ile birlikte bitki savunmasında kullanılmaktadır. Bunların birlikte, kullanımı patojenik mikroorganizmaların öldürülmesinde hızlandırıcı olarak kullanılabilir (Sharma et al., 2011). Fungal patojenler bakımından in vitro deneyler göstermektedir ki kitinazların etki biçimi; pek çok fungal türün gelişimini hif uçlarını lizise uğratarak inhibe ederler. Bunu, fungus hücre duvarındaki kitinin hidrolizi yoluyla yaparlar (Zhang et al., 2013). Ayrıca, bitkilerin tohumlarının çimlenmesi sırasında, fungal hücre duvarını hedefleyerek, patojenik enfeksiyonu azaltan çeşitli sınıf IV kitinazların salgıladıkları gösterilmiştir. Örneğin; Mısır (*Zea mays*) bitkisinin, *Fusarium* ve *Bipolaris* mantar türlerine karşı korunmaya yardımcı olan iki sınıf IV kitinazı (ChitA ve ChitB) ürettiği gösterilmiştir (Price et al., 2015). Kitinaz dolaylı olarak böcek ve zararlıların popülasyonlarının kontrolünde de görev almaktadır. Ortamdaki kitin değişimi kitinaz üretimini artırır. Bu da böceklere, zararlılara ve bitki patojenlerine karşı biyo-kontrolör görevi görür (Senthilraja et al., 2013). Kitinazlar, bir çeşit sinyal molekülleri olan kito-oligosakkaridlerin ve bitkilerde patojenin biyo-kontrolünün temelini oluşturan etilen gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanmasıyla indüklenebilirler (Kasprzewska et al., 2003).

### Biyoteknolojide kullanımları

Günümüzde genetik mühendisliğin gelişmesiyle beraber bitkilere istenilen özelliklerin kazandırılması için gen aktarımları ya da gen susturma teknolojilerinden faydalanılmaktadır. Transgenik bitkilerde, endüstriyel uygulamalar için enzimlerin ekspresyonu ve saflaştırılması ile ilgili ksilanaz, transglutaminaz, endoglukanaz, lakkaz ve kitinaz dahil olmak üzere bir çok protein için başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Di Maro et al., 2010). Kitinazın transgenik overekspresyonu hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarına karşı gelişmiş tolerans göstermiştir (Kumar et al., 2016). Son yıllarda, kitinazı daha fazla üreten transgenik bitkilerin üretimi bitki savunmasını arttırmak için kullanılmaktadır. Bu, hücre dışı enzimlerin aktivitesinin manipülasyonu, enzim negatif mutantlar veya transgenik bitkilerin kullanımı ile olmaktadır (Sharma et al., 2011). Transgenik bitkilerde kitinaz için donör olarak kullanılan başlıca bitkiler şunlardır; *Beta vulgaris*, *Brassica juncea*, *Cucumis sativus*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon chilense*, *Lycopersicon esculentum*, *Momordica charantia*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Petuni* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum* ve *Zea mays* (Grover, 2012). Kitinaz genleri tek başlarına ya da  $\beta$ -1,3-glukanaz genleri ile birlikte bir dizi bitki türüne transfer edilerek etkileri incelenmiştir. Kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında transgenik bitkilerin sonuçları çoğu durumda daha artan seviyede fungal hastalıklara direnç veya gecikmiş hastalık belirtileri sergilemişlerdir. Fakat bazı çalışmalar kitinaz ve  $\beta$ -1,3-glukanaz genlerinin birlikte aktarımının daha etkili olduğunu göstermiştir (Grover, 2012; Senthilraja et al., 2013). Ayrıca kitinaz gibi birçok bitki defensini, fungal patojenlere karşı etkili bir direnç sağlanması için tanımlanmış, karakterize edilmiş ve ticari öneme sahip tarla bitkilerine aktarılmıştır (Ghag et al., 2016). Bunun yanında,  $\beta$ -1,3-glukanaz, taumatin benzeri proteinler, kitinazlar ve bir poligalakturonaz inhibitör proteinini içeren çeşitli antifriz aktivitesi olan PR proteinleri de bitkilerden izole edilmiştir (Griffith and Yaish, 2004). Bir çok çalışmada bu ve benzeri kitinazlar çeşitli bitkilere transfer edilerek patojenlere karşı arttırılmış direnç elde edilmiştir (Ignacimuthu and Ceasar, 2012; Pan et al, 2013; Molla et al., 2016).

## SONUÇ

Bitki kitinazları, glikozid hidrolazlardan GH18 ve GH19 ailelerine ait 7 sınıf içerisinde tanımlanan, bitkilerin savunma mekanizmalarında oldukça etkili işlevleri olan enzimlerdir. Özellikle GH19 ailesi bitkiler için özelleşmiş kitinazları içerir. Bunlardan en önemlisi PR olarak bilinen “patojen bağıntılı proteinler”den oluşmaktadır. Kitinazların biyoteknolojide, tarımda ve diğer çevresel alanlarda geniş bir kullanımı vardır. Bitki kitinazları çeşitli patojen organizmalara karşı

biyopestisit ajan olarak kullanılırlar. Son yıllarda, ticari öneme sahip bitkilere gen mühendisliği teknikleri kullanılarak kitinazlar aktarılmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde artan nüfusa bağlı olarak besin kıtlığı oluşmaktadır. Başta bu ihtiyacın karşılanabilmesinde, kitinaz proteinlerinin tanınması, işlevlerinin anlaşılması ve biyoteknolojik uygulamalardan yararlanması biyotik ve abiyotik etkilere karşı dirençli bitkiler geliştirilmesi bakımından önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Adrangi S, Faramarzi MA, 2013. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv.*, 31(8):1786-1785.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC, 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.*, 47: 79-87
- Arie M, Hikichi K, Takahashi K, Esaka M, 2000. Characterisation of basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. *Plant Physiol*, 110(2): 232-239.
- Bhattacharjee B, Pathaw N, Chrungoo NK, Bhattacharjee A, 2017. Molecular modelling, dynamics simulation and characterization of antifungal chitinase from *Sechium edule*. *Gene*, 606: 39-46. doi:10.1016/j.gene.2016.12.007.
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK, 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotech.*, 27(1): 21e8.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B, 2009. The Carbohydrate- Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37: D233-8
- Cletus J, Balasubramanian V, Vashisht D, Sakthivel N, 2013. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. *Biotechnol Lett.*, 35(11): 1719-1732.
- Di Maro A, Terracciano I, Sticco L, Fiandra L, Ruocco M, Corrado G, Parente A, Rao R, 2010. Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. *J Biotechnol.*, 147(1):1-6.
- Epple P, Apel K, Bohlmann H, 1995. An Arabidopsis thaliana thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.*, 109: 813-820.
- Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, Valle D, Rezende GL, 2015. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol.*, 83:43-52.
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M, 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.*, 3: 72-74.
- Ghag SB, Shekhawat UKS, Ganapathi TR, 2016. Plant Defensins for the Development of Fungal Pathogen Resistance in Transgenic Crops: Production, Safety, Regulation and Public Health. Elsevier Inc., 381-396.
- Govindsamy V, Gunaratna KR, Balasubramanian R, 1998. Properties of extracellular chitinase from *Myrothecium verrucaria*, an antagonist to the groundnut rust *Puccinia arachidis*, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20(1): 62-68
- Green TR, Ryan CA, 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175: 776-777.
- Griffith M, Yaish MWF, 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends Plant Sci.*, 9(8): 399-405.
- Grover A, 2012. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *CRC Crit Rev Plant Sci.*, 31: 57-73.
- Hahn M, Hennig M, Schlesier B, Hohne W, 2000. Structure of jack bean chitinase. *Acta Crystallog. Sect D*, 56: 1096-1099.
- Hart PJ, Pfluger HD, Monzingo AF, Hollis T, Robertus JD, 1995. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 248: 402-413.
- Ignacimuthu S, Ceasar SA, 2012. Development of transgenic finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) resistant to leaf blast disease. *J Biosci* 37: 135-147.
- Ju Y, Wang X, Guan T, Peng D, Li H, 2016. Versatile glycoside hydrolase family 18 chitinases for fungi ingestion and reproduction in the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Int J Parasitol.*, 46: 819-828.
- Karthik N, Binod P, Pandey A. *Chitinases.*; 2017. Chitinases. In book: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, pp.335-368 doi:10.1016/B978-0-444-63662-1.00015-4.
- Kasprzewska A, 2003. Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 8(3): 809e24.
- Khoushab F, Yamabhai M. 2010. Chitin research revisited. *Marine Drugs*. 8(7): 1988-2012.
- Kumar SA, Kumari PH, Jawahar G, Prashanth S, Suravajhala P, Katam R, Sivan P, Rao KS, Kirti PB, Kishor KPB, 2016. Beyond just being foot soldiers – osmotin like protein (OLP) and chitinase (Chi11) genes act as sentinels to confront salt, drought, and fungal stress tolerance in tomato. *Environ Exp Bot.*, 132: 53-65.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S, 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 7542-7546.
- Li H, Wang D, Deng Z, Huang G, Fan S, Zhou D, Liu B, Zhang B, Yu D, 2016. Molecular characterization and expression analysis of chitinase from the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.*, (In press) doi:10.1016/j.cbpb.2016.10.007.

- Li L, Yi H, 2012. Differential expression of Arabidopsis defense-related genes in response to sulfurdioxide. *Chemosphere*, 87: 718–24.
- Melchers LS, Apotheker-de Groot M, van der Knaap JA, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJ, van den Elzen PJ, Linthorst HJ, 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J.*, 5: 469-480
- Metraux JP, Streit L, Staub T, 1988. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 33: 1-9.
- Mizuno R, Fukamizo T, Sugiyama S, Nishizawa Y, Kezuka Y, Nonaka T, Suzuki K, Watanabe T, 2008. Role of the loop structure of the catalytic domain in rice class I chitinase. *J Biochem.* 143(4): 487-95.
- Molla KA, Karmakar S, Chanda PK, Sarkar SN, Datta SK, Datta K, 2016. Tissue-specific expression of Arabidopsis NPR1 gene in rice for sheath blight resistance without compromising phenotypic cost. *Plant Sci.*, 250: 105-114.
- Naumann TA., Wicklow DT, 2013. Chitinase modifying proteins from phylogenetically distinct lineages of Brassica pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 82: 1-9.
- Neuhaus JM, 1999. Plant chitinases. In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds.) Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, USA, 86-114 pp.
- Nishizawa Y, 2005. Roles of Chitinases and beta-1,3-Glucanases in Plant Defense. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycobiology/PS-A04E.html> (Erişim tarihi: 10 Kasım, 2016)
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mole. Biol.* 2000; 42: 479–488.
- Ouyang SW, Zhao KJ, Feng LX, 2001. The structure and function, classification and evolution of plant chitinases. *Chinese Bulletin of Botany*, 18(4): 418-426.
- Pan XQ, Fu DQ, Zhu BZ, Lu CW, Luo YB, 2013. Overexpression of the ethylene response factor SIERF1 gene enhances resistance of tomato fruit to *Rhizopus nigricans*. *Postharv Biol Technol.*, 75: 28-36.
- Porat R, Vinokur V, Holland D, McCollum TG, Droby S. 2001. Isolation of a citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. *J Plant Physiol.*, 158: 1585-1590. doi:10.1078/0176-1617-00585.
- Price NPJ, Momany FA, Schnupf U, Naumann TA, 2015. Structure and disulfide bonding pattern of the hevein-like peptide domains from plant class IV chitinases2. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 89(1): 25-30.
- Sarma K, Dehury B, Sahu J, Sarmah R, Sahoo S, Sahu M, Sen P, Modi MK, Barooah M, 2012. A comparative proteomic approach to analyse structure, function and evolution of rice chitinases: a step towards increasing plant fungal resistance. *J Mol Model*, 18(11): 4761–80.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC, 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem.*, 46(11): 941-950.
- Senthilraja G, Anand T, Kennedy JS, Raguchander T, Samiyappan R, 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Entomopathogenic Fungus Bioformulation Enhance The Expression of Defense Enzymes and Pathogenesis-Related Proteins in Groundnut Plants Against Leafminer Insect and Collar Rot Pathogen, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 82: 10-19.
- Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Gupta VK, 2011. Role of Chitinase in Plant Defense. *Asian Journal of Biochemistry*, 6: 29-37.
- Sharma V, 2013. Pathogenesis related defence functions of plant chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Vegetos.*, 26: 205-218.
- Sietsma JH. Wessels JGH, 1979. Evidence for Covalent Linkages between Chitin and  $\beta$ -Glucan in a Fungal Wall. *J Gen Microbiol.*, 114(1): 99-108.
- Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K, 1986. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 2427-2430.
- Suginta W, Sirimontree P, Sriro N, Ohnuma T, Fukamizo T, 2016. The Chitin-Binding Domain of a GH-18 Chitinase from *Vibrio harveyi* is Crucial for Chitin-Chitinase Interactions. *Int J Biol Macromol.*, 93: 1111-1117.
- Synowiecki J, Al-Khateeb NA, 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci.*, 43(2): 145-171.
- Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7: 573-588.
- Terwisscha van Scheltinga AC, Kalk KH, Beintema JJ, Dijkstra BW, 1994. Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure*, 2(12): 1181-1189.
- Van Loon LC, 1982. Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection, in: R.K.S. Wood (Ed.), *Active Defense Mechanisms in Plants*, Plenum Press, New York, USA, pp. 247-273.
- Van Loon LC, 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis related proteins. In: Dutta SK, Muthukrishnan S (eds.) Pathogenesis related proteins in plants. CRC Press, Boca Raton, USA, 1-19 pp.
- Velazhahan R, Samiyappan R, Vidhyasekaran P, 2000. Purification of an elicitor-inducible antifungal chitinase from suspension-cultured rice cells. *Phytoparasitica*, 28: 131-139.
- Vera P, Conejero V, 1988. Pathogenesis-related proteins of tomato P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol.*, 87: 58-63.
- Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H, 1998. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus, *Plant Mol. Biol.*, 36: 101–112.
- Xayphakatsa K, Tsukiyama T, Inouye K, Okumoto Y, Nakazaki T, Tanisaka T, 2008. Gene cloning, expression, purification and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) class II chitinase CHT11. *Enzyme Microb Technol.*, 43(1): 19-24.
- Xu F, Fan C, He Y, 2007. Chitinases in *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Genetics and Genomics*, 34(2): 138-150.
- Zhang J, Kopparapu NK, Yan Q, Yang S, Jiang Z, 2013. Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. *Food Chem.*, 138(2-3): 1225-1232.
- Zhang Z, Collinge DB, Thordal-Christensen H, 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.*, 8: 139–145.