

## CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E PERFIL DE EXPRESSÃO *IN SILICO* DE QUITINASES DO CAFEST<sup>1</sup>

Samuel Mazzinghy Alvarenga<sup>2</sup>; Eveline Teixeira Caixeta<sup>3</sup>; Eunize Maciel Zambolim<sup>4</sup>; Laércio Zambolim<sup>5</sup>; Ney Sussumu Sakiyama<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (Consórcio Pesquisa Café), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

<sup>2</sup>Doutorando em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, samalvarenga@gmail.com

<sup>3</sup>Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br, autor para correspondência

<sup>4</sup>Pesquisadora, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, eunize@ufv.br

<sup>5</sup>Professor, Ph.D., Universidade Federal de Viçosa, zambolim@ufv.br

<sup>6</sup>Professor, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, sakiyama@ufv.br

**RESUMO:** O CafEST é a base de dados que armazena as 200 mil ESTs geradas pelo Projeto Brasileiro do Genoma Café. Em trabalho anterior, sequências potencialmente associadas com a defesa do cafeeiro a doenças foram identificadas. Entre essas sequências, genes de quitinases. As proteínas codificadas por esses genes são enzimas que podem desempenhar funções como metabolismo de quitina, mecanismos de defesa contra patógenos e estresse abiótico, nutrição, parasitismo entre outras. Dada a importância desta enzima para a planta, o objetivo do presente trabalho foi analisar as ESTs de quitinase identificadas previamente. Para isso foi realizada uma caracterização funcional das sequências e construído um perfil de expressão *in silico*. Os resultados mostraram que essas proteínas estão envolvidas em importantes processos biológicos e funções moleculares nas células da planta e estão mais expressas, principalmente, em bibliotecas que apresentam algum componente de estresse.

**Palavras-Chave:** *Coffea*, genoma, bioinformática

## FUNCTIONAL CHARACTERIZATION AND *IN SILICO* EXPRESSION PROFILE OF CHITINASES FROM CAFEST

**ABSTRACT:** CafEST is the database that stores the 200,000 ESTs generated by the Brazilian Coffee Genome Project. In previous work, sequences potentially associated with the defense of coffee to diseases were identified. Among these sequences, chitinase genes. The proteins encoded by these genes are enzymes that can perform functions such as chitin metabolism, plant defense mechanisms against pathogens and abiotic stresses, nutrition, parasitism among others. Given the importance of this enzyme to the plant, the objective of this study was to analyze the chitinase ESTs previously identified. To do that, we performed a functional characterization of the sequences and constructed an *in silico* expression profile. Results showed that these proteins are involved in important biological processes and molecular functions in the plant cell and are expressed mostly in libraries that show some stress component.

**Key words:** *Coffea*, genome, bioinformatics

### INTRODUÇÃO

O Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC) gerou um banco de dados de 200.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (Vieira et al., 2006). Estas sequências estão armazenadas no banco de dados do PBGC, o CafEST (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Com o intuito de identificar fatores genéticos determinantes e/ou associados com a resistência do cafeeiro a doenças, Alvarenga (2007) realizou uma análise *in silico* das sequências do CafEST. Neste trabalho, foram identificadas 14.060 sequências relacionadas com o processo de defesa da planta contra doenças como, por exemplo, quitinases, proteínas quinase, citocromo P450, proteínas de resistência a doenças, proteínas relacionadas com a patogênese, proteínas com domínio LRR e NBS, proteínas induzidas por hipersensibilidade, entre outras.

Dessas 14.060 sequências, 1.855 eram quitinases. As quitinases estão presentes em bactérias, fungos, plantas, insetos, crustáceos e alguns vertebrados, podendo apresentar várias funções como metabolismo de quitina, mecanismos de defesa contra patógenos e estresse abiótico, nutrição e parasitismo (Matsumoto, 2006).

As quitinases pertencem às famílias de enzimas glicosil hidrolase 18 e 19, de acordo com a classificação feita por Henrissat e Bairoch (1993). Elas catalisam a hidrólise de quitina, um homopolímero linear de unidades de  $\beta$ -1,4 N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) (Collinge et al., 1993) que é comumente encontrado em exoesqueleto de insetos, concha de crustáceos e em parede celular de fungos. A hidrólise enzimática de quitina é realizada por meio de um sistema quitinolítico. Desta forma as enzimas podem ser endoquitinases, exoquitinases, quitobiasas,  $\beta$ N-acetil hezosaminidases, entre outras classificações.

Dada a importância desta enzima, tanto na interação planta-patógeno, como em outros processos da planta, o objetivo do presente trabalho foi analisar as ESTs de quitinase identificadas por Alvarenga (2007). Para isso foi realizada uma caracterização funcional das sequências e construído um perfil de expressão *in silico*. Uma categoria (ou

classe) funcional se refere ao processo biológico, componente celular ou função molecular que o produto de um dado gene pode desempenhar. O perfil de expressão pode mostrar em quais condições a planta tem uma maior atividade dos genes de quitinase. A caracterização funcional, juntamente com o perfil de expressão, possibilita incorporar informações importantes sobre os genes de quitinase do cafeeiro, contribuindo para o entendimento de como eles atuam na planta.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Sequências de DNA*

Foram adotadas nesse trabalho as sequências de quitinases do CafEST identificadas por Alvarenga (2007). As 1.855 ESTs encontradas pelo sistema *Gene Projects* (Carazzolle et al., 2007) foram clusterizadas, formando 47 EST-*contigs* e 48 *singlets*. Apenas os EST-*contigs* com *e-value* < e-20 e *score* > 100 foram selecionados para a caracterização funcional e a construção do perfil de expressão *in silico*.

### *Caracterização funcional*

A categorização funcional dos EST-*contigs* selecionados foi feita com o *software* Blast2GO (Conesa et al., 2005). O procedimento se iniciou com a realização de um BlastX de todas os EST-*contigs* contra o banco de dados *nr* do NCBI (*National Center for Biotechnology and Information*). O *e-value* máximo do melhor *blast hit* foi ajustado para 1e-10 e o tamanho mínimo do alinhamento (*HSP length*) para 33. Baseando-se no resultado do BlastX, o Blast2GO extrai termos do *Gene Ontology* (GO) para cada EST-*contig*. A distribuição dos termos GO foi analisada ao nível 3 dos Gráficos Acíclicos Dirigidos (DAG – *Directed Acyclic Graphs*). As três categorias de termos designados eletronicamente foram Função Molecular, Processo Biológico e Componente Celular. Posteriormente, os EST-*contigs* foram submetidos ao InterProScan do EBI (*European Bioinformatics Institute*), visando identificar domínios conservados. O InterPro é um banco de dados que acumula informações sobre domínios, motivos e regiões conservadas nas proteínas e famílias de proteínas disponibilizadas por outros bancos de dados que incluem PROSITE, PRINTS, ProDom, Pfam, SMART, TIGRFAMs, PIRSF, UPERFAMILY e PANTHER. A última etapa do Blast2GO consistiu na anotação de ECs (*Enzyme Codes*) e busca de mapas metabólicos do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) para as EST-*contigs*.

### *Perfil de expressão in silico*

O perfil de expressão gênica *in silico* foi determinado por meio de análises de *Northern Blot* Virtual (VNB – *Virtual Northern Blot*) dos EST-*contigs* selecionados. A frequência dos *reads* de cada EST-*contig* para uma determinada biblioteca foi calculada e normalizada. O número de *reads* que compõe cada EST-*contig* foi multiplicado por um fator de normalização de cada biblioteca. O fator de normalização foi obtido pela divisão do número total de *reads* de todas as bibliotecas pelo número de *reads* de cada biblioteca. Foi gerada uma matriz de correlação entre o número de *reads* de cada EST-*contig* e as bibliotecas. O padrão de expressão gênica entre EST-*contigs* e bibliotecas foi obtido por meio de clusterização hierárquica, baseado na matriz de distância euclidiana e no método de ligação *average linkage*, usando o *software* Genesis v. 1.7.5 (Sturn et al., 2002). Os resultados do *Northern Blot* virtual, também obtidos pelo programa Genesis, foram apresentados em forma gráfica de *heat map*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 47 EST-*contigs* de quitinases identificados por Alvarenga (2007), 45 tinham *e-value* < e-20 e *score* > 100. Esses foram selecionados para a caracterização funcional e a construção do perfil de expressão *in silico*.

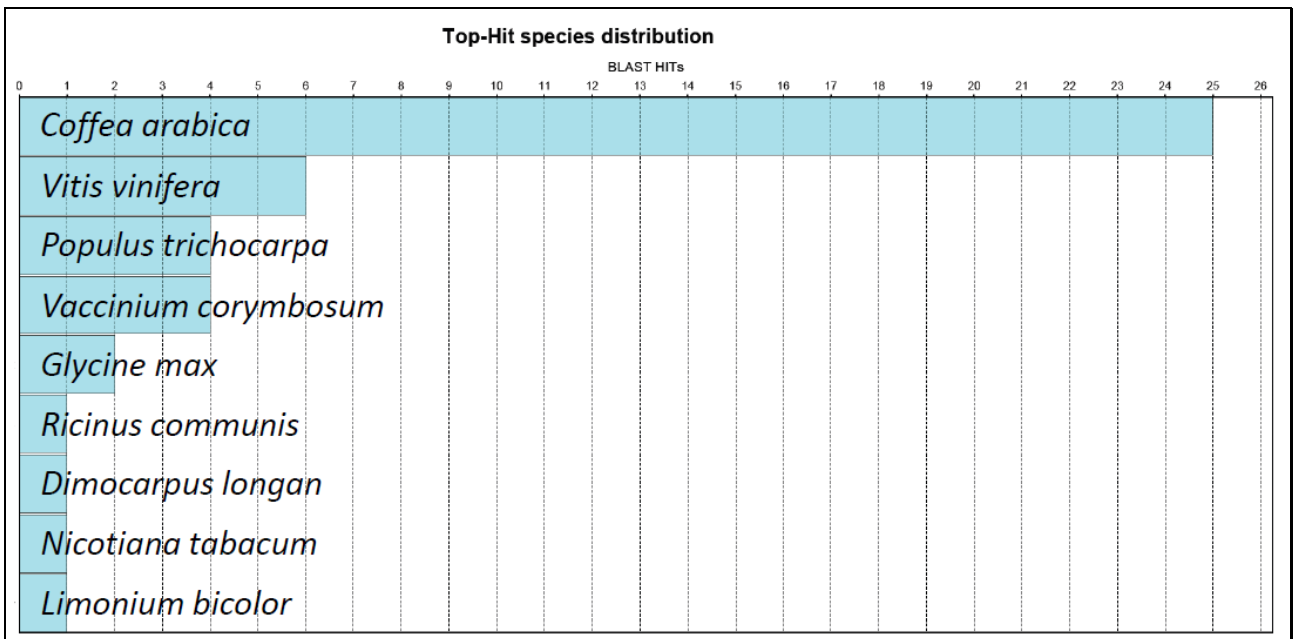
Nos dados analisados foram encontradas apenas enzimas da família glicosil hidrolase 18. As quitinases da família 18 estão presentes em vários organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas insetos, mamíferos e vírus (Matsumoto, 2006). Os membros desta família são sensíveis a alosamidina, um potente inibidor de quitinases. Por outro lado, as quitinases da família 19 parecem ser tolerantes a esse inibidor (Koga et al., 1987). Os membros dessa família são encontrados em plantas e em algumas linhagens de *Streptomyces*. Há relatos que essas quitinases são similares à lisozima e à quitosanase, as quais possuem domínio catalítico com alto conteúdo de  $\alpha$ -hélice (Matsumoto, 2006).

A maior parte dos EST-*contigs* analisados pertence a classe de endoquitinases (EC:3.2.1.14) ou amilases (EC:3.2.1.0). Esta última tem a propriedade de clivar especificamente ligações O-glicosídicas (Yaldagard et al., 2007), enquanto a primeira cliva aleatoriamente as cadeias de quitina, produzindo oligômeros de baixo peso molecular (Matsumoto, 2006). Algumas quitinases de planta também apresentam atividade de lisozima (EC:3.2.1.17) (Collinge et al., 1993), como aconteceu com os EST-*contigs* 38 e 45. Enzimas desta classe hidrolisam ligações glicosídicas o entre ácido N-acetilmurâmico e a N-acetil hexosamina. A análise mostrou ainda que, diferentemente dos demais, o EST-*contig* 29 apresentou atividade de glucanase (EC:3.2.1.39) que tem sido relatada como inibidora de crescimento fúngico (Van Loon e Van Strien, 1999).

As quitinases também são classificadas de acordo com a sua estrutura primária. São cinco classes no total (I a V), porém somente as classes de I a IV foram encontradas nos dados analisados.

A busca pelo BLAST mostrou que as EST-*contigs* apresentaram similaridade, principalmente, com sequências de *Coffea arabica* (25) e *Vitis vinifera* (6) (Figura 1). Um estudo sobre a evolução e a composição genômica de *C.*

*canephora* revelou uma considerável conservação da microcolinearidade entre esta espécie e *V. vinifera* (Guyot et al., 2009). Esses autores relataram ainda um alto nível de conservação entre os genomas de *C. canephora* e outras espécies dicotiledôneas como *Solanum lycopersicon* e *P. trichocarpa*.



**Figura 1** – Distribuição das espécies mais encontradas na busca do BLAST

A função molecular com o maior número de termos associados com as sequências de quitinases foi “atividade de hidrolase” (Figura 2). Este resultado está de acordo com os estudos que demonstram que essas enzimas catalisam a hidrólise de quitina. Por causa dessa propriedade, desde que foram descritas pela primeira vez em 1911, as quitinases são consideradas como uma ferramenta de fortalecimento da resposta imune de plantas contra patógenos (Sharma et al., 2011). Além disso, o aumento do nível dessas moléculas devido a fatores abióticos e bióticos também contribui para demonstrar o seu papel na resposta de defesa da planta (Gupta et al., 2010).

A análise da categoria Componente Celular revelou que o termo mais associado com as EST-*contigs* foi parede celular (Figura 3). As quitinases podem ser encontradas em paredes celulares de organismos como os fungos, onde a quitina é um constituinte bastante comum. Neste caso, as quitinases podem ser requisitadas tanto para a morfogênese das paredes celulares como para a lise de quitina, quando há demanda de energia pela célula (Gooday, 1977). Já em plantas, ensaios imunocitoquímicos e estudos de fracionamento celular demonstraram que algumas quitinases da classe I estão localizadas em vacúolos, enquanto outras quitinases estão localizadas apoplásticamente, ou seja, no espaço intercelular (Boller e Métraux, 1988).

O aumento da atividade das quitinases e de outras proteínas relacionadas com a patogênese no processo de defesa da planta envolve uma enorme redistribuição de energia em direção à resposta de defesa contra patógenos (Bolton, 2009). Portanto a habilidade da célula vegetal em recrutar energia por meio de vias metabólicas que produzem energia (metabolismo primário) é fundamental para a planta. Este cenário foi detectado no resultado da análise dos processos biológicos. A maior parte dos termos dessa categoria foi “processo metabólico primário” e “processo metabólico de macromoléculas” (Figura 4).

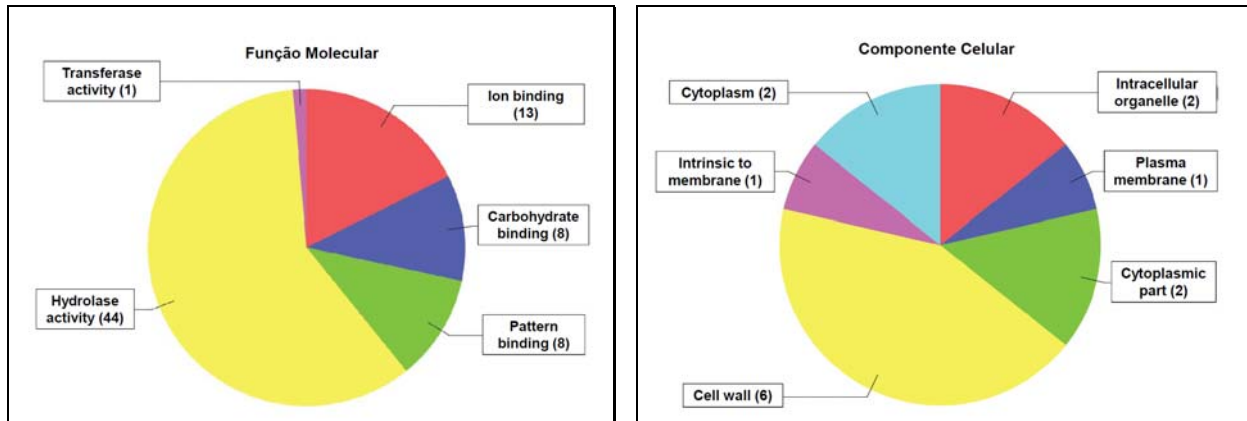


Figura 2 – Distribuição dos termos GO na categoria Função Molecular, nível 3.

Figura 3 – Distribuição dos termos GO na categoria Componente Celular, nível 3.

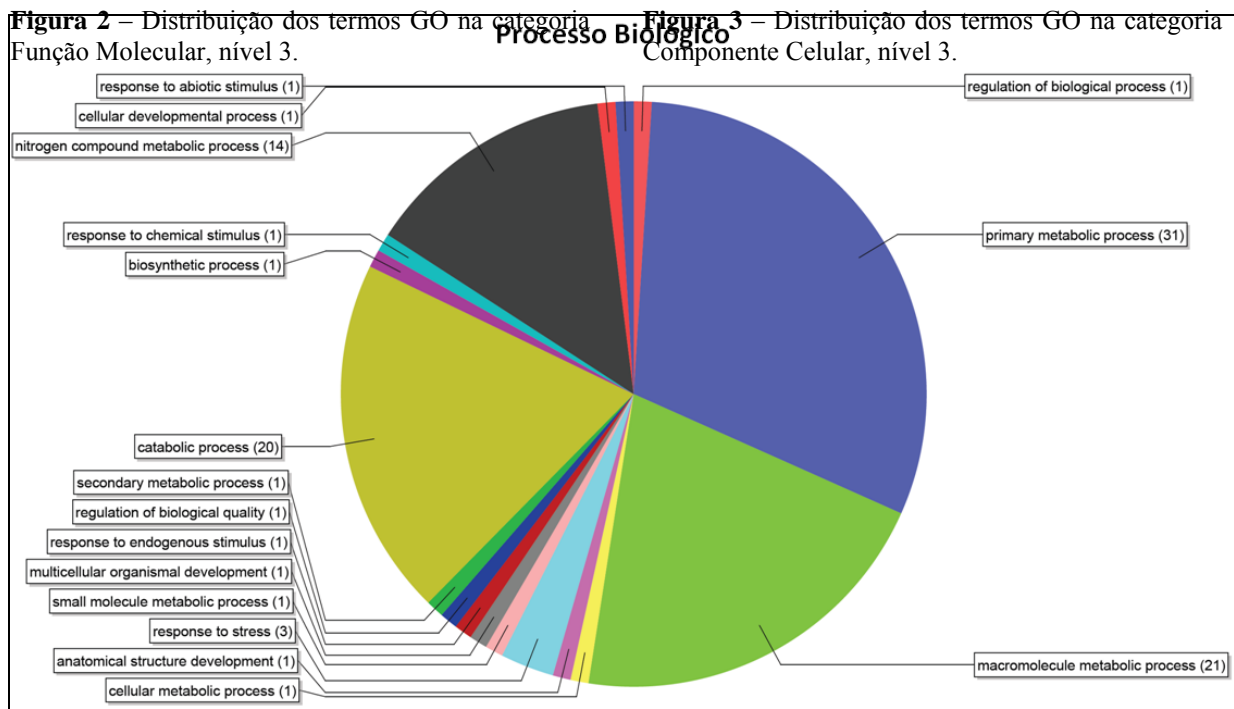
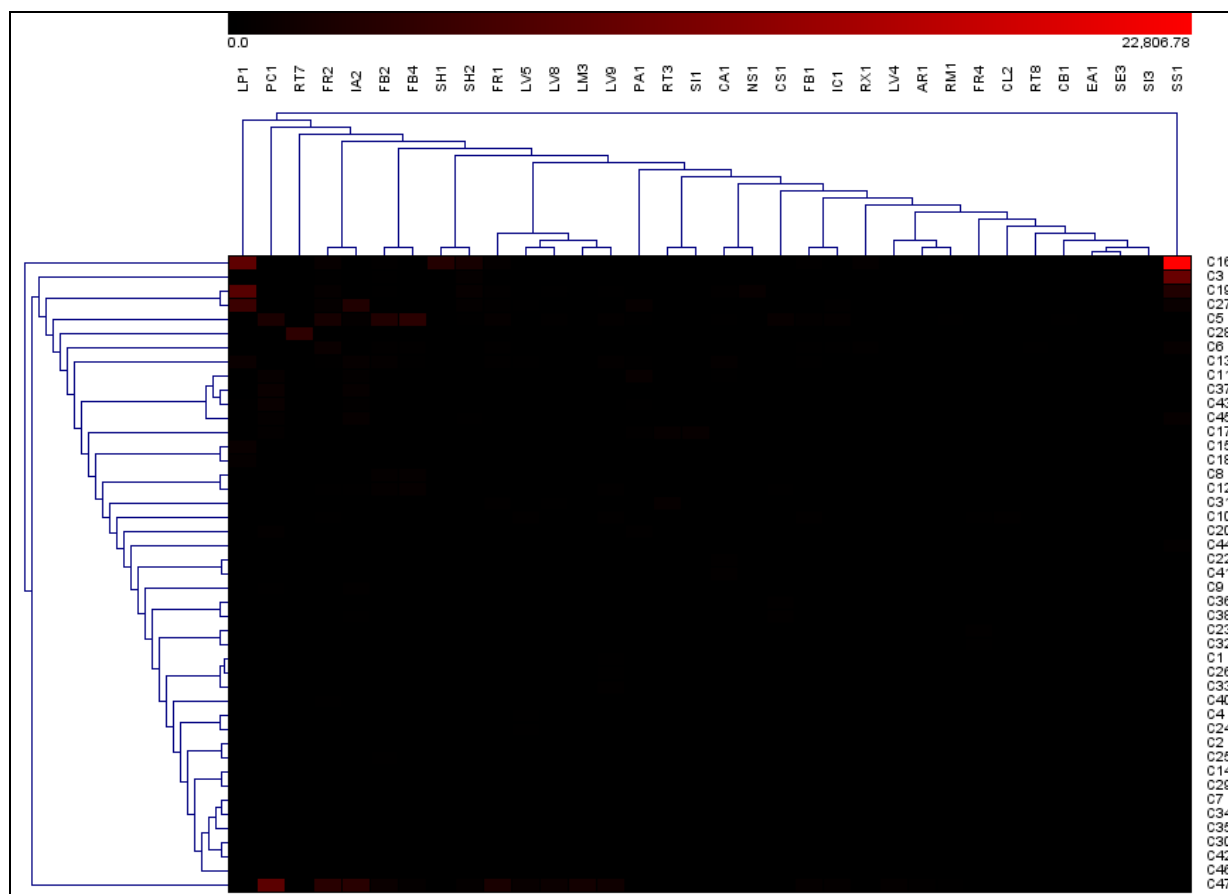


Figura 4 – Distribuição dos termos GO na categoria Processo Biológico, nível 3.

A expressão das quitinases foi mais evidente nas bibliotecas LP1 (plântulas com tratamento de ácido araquidônico), PC1 (linhagem não embriogênica de folhas com indução de 2,4D), RT7 (def.), FR2 (botão floral e frutos em estágios diferentes), IA2 (linhagem embriogênica de folhas com indução de 2,4D), FB2 e FB4 (botão floral em diferentes estágios de desenvolvimento), SH1 (folhas de *C. canephora* em estresse hídrico), SH2 (folhas de *C. arabica* em estresse hídrico) e SS1 (condições normais) (Figura 5).



**Figura 5** – Heat map do perfil de expressão das quitinases nas bibliotecas do CafEST.

Todas essas bibliotecas, com exceção da SS1, apresentam algum componente de estresse, o que leva a inferir que as quitinases, de algum modo, podem estar envolvidas neste processo, ou, mais especificamente, no processo de resposta contra esses estresses. O ácido araquidônico (AA), por exemplo (biblioteca LP1), é uma molécula sinalizadora que induz estresse e ativa redes metabólicas de defesa em plantas (Savchenko et al., 2010). Alguns estudos demonstraram que o AA é um potente elicitor de morte celular programada e de resposta de defesa em solanáceas (Bostock et al., 1981; Knight et al., 2001; Garcia-Pineda et al., 2004). Foi relatado ainda que o AA induz resistência a vírus em batata e tabaco (Rozhnova et al., 2003; Ozeretskovskaya et al., 2004) e que induz uma resposta de hipersensibilidade em protoplastos de batata similar àquela induzida por componentes da parede celular do fungo *Phytophthora infestans* (Davis e Currier, 1988). Já o 2,4D (bibliotecas PC1 e IA2) é um herbicida sistêmico seletivo usado no controle de plantas daninhas. Além de herbicida, o 2,4D também pode atuar na regulação do crescimento da planta (Tomlin, 2006).

A verificação de um alto nível de expressão de quitinases em condições normais (biblioteca SS1) pode ser devido ao fato de que estas enzimas estão entre os genes mais expressos em café (Lin et al., 2005). Entretanto, há um outro fator relevante que provavelmente é o que explica melhor este resultado. A biblioteca SS1 é composta por apenas 702 reads. Desta forma, quando a frequência dos reads é normalizada, o fator de normalização desta biblioteca se torna extremamente alto. Desta forma, um EST-contig que seja formado por poucos, ou apenas um read proveniente desta biblioteca já terá o seu perfil de expressão bastante elevado na biblioteca SS1.

As quitinases são proteínas relacionadas com a patogênese e a sua função na defesa contra patógenos já foi determinada (Yeboah et al., 1998). Entretanto, estudos relataram a ação dessas proteínas em outros processos fisiológicos da planta, como regulação do crescimento e do desenvolvimento (Samac e Shah, 1991; Van der Holst et al., 2001; Kwon et al., 2005), morte celular programada (Passarinho et al., 2001), simbiose (Ovstyna et al., 2005) e tolerância a vários estresses ambientais (Hamel e Bellemare, 1995; Yun et al., 1996; Pinheiro et al., 2001; Tateishi et al., 2001). As quitinases parecem atuar também no processo de defesa contra estresse hídrico em plantas. Lee et al. (2008) investigaram as respostas de proteínas PR na intensidade de estresse hídrico em trevo branco (*Trifolium repens* L.). Foi observado um aumento na atividade de proteínas PR juntamente com uma diminuição no potencial hídrico. A atividade das quitinases se manteve crescente durante todo o período do experimento. Esses resultados indicaram que o aumento da atividade das quitinases e outras proteínas PR nos primeiros dias do experimento pode ser um ato de tolerância temporária a estresse hídrico, mas a ativação dessas enzimas durante a fase terminal do estresse pode ser um sintoma induzido pelo estresse hídrico.

Já foi demonstrado, em várias espécies de plantas, que as quitinases são expressas em órgãos como flores, folhas, sementes e raízes (Samac and Shah, 1991; Graham and Sticklen, 1994; Wemmer et al., 1994; Van Hengel et al., 1998; Ancillo et al., 1999; Domon et al., 2000; Regalado et al., 2000; Takakura et al., 2000; Passarinho et al., 2001). Sugere-se que algumas dessas quitinases expressas constitutivamente, possivelmente estão envolvidas na defesa da planta, o que dificulta o início da colonização por patógenos (Graham e Sticklen, 1994). As quitinases que são tecido-específicas e não são induzidas por patógenos ou estresses podem ter papel no crescimento e desenvolvimento da planta (Zhong et al., 2002).

Os EST-*contigs* mais expressos nessas bibliotecas foram C16, C3, C19 e C47, todos caracterizados apenas como “*protein*”, com função molecular de atividade de hidrolase de componentes o-glicosil e com atividade enzimática de amilase (EC:3.2.1.0). As amilases são uma classe de hidrolases amplamente distribuídas na natureza. Essas enzimas podem clivar especificamente as ligações o-glicosídicas em amido e em outros oligo e polissacarídeos (Yaldagard et al., 2007).

## CONCLUSÕES

Quitinases presentes no genoma do cafeeiro foram analisadas neste trabalho. A caracterização funcional mostrou a versatilidade dessa proteína, que possui atividade enzimática e está envolvida em importantes processos biológicos e funções moleculares nas células da planta. A análise do perfil de expressão *in silico* das quitinases no genoma do cafeeiro permitiu verificar que essas proteínas estão mais expressas, principalmente, em bibliotecas que apresentam algum componente de estresse. Estes resultados confirmam que as quitinases, de algum modo, estão envolvidas neste processo, ou, mais especificamente, no processo de resposta contra esses estresses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga SM (2007) Caracterização de sequências expressas do genoma café potencialmente relacionadas com a resistência a doenças. Dissertação. Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 107p.
- Ancillo G, Witte B, Schmelzer E, Kombrink E (1999) A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. *Plant Mol. Biol.*, 39:1137–1151.
- Boller T; Métraux JP (1988) Extracellular localization of chitinase in cucumber. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 33:11-16.
- Bolton MD (2009) Primary Metabolism and Plant Defense - Fuel for the Fire. *MPMI*, 22:487-497.
- Bostock RM, Kuc JA, Laine RA (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*, 212:67–69.
- Carazzolle MF; Formighieri EF; Digiampietri LA; Araujo MRR; Costa GGL; Pereira GAG (2007) Gene projects: A genome Web tool for ongoing mining and annotation applied to CitEST. *Genetics and Molecular Biology*, 30:1030-1036.
- Collinge DB; Kragh KM; Mikkelsen JD; Nielsen KK; Rasmussen U; Vad K (1993) Plant chitinases. *The Plant Journal*, 3:31-40.
- Conesa A, Götz S, García-Gomez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21:3674-3676.
- Davis DA, Currier WW (1988) The toxic effect of arachidonic acid and other unsaturated fatty acids on potato tuber cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33:105-114.
- Domon J-M, Neutelings G, Roger D, David A, David H (2000) 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.*, 156:33–39.
- Garcia-Pineda E, Castro-Mercado E, Lozoya-Gloria E (2004) Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Sci.*, 166:237–243.
- Gooday GW (1977) Biosynthesis of the fungal wall - mechanisms and implications. *Journal of General Microbiology*, 99:1-11.
- Graham LS, Sticklen MB (1994) Plant chitinases. *Can. J. Bot.*, 72:1057–1083.
- Gupta VK; Misra AK; Gaur RK; Jain PK; Gaur D; Sharma S (2010) Current Status of *Fusarium* Wilt Disease of Guava (*Psidium guajava* L.) in India. *Biotechnology*, 9:176-195.
- Guyot R; Mare M; Viader V; Hamon P; Coriton O; Bustamante-Porras J; Poncet V; Campa C; Hamon S; Kochko A (2009) Microcollinearity in an ethylene receptor coding gene region of the *Coffea canephora* genome is extensively conserved with *Vitis vinifera* and other distant dicotyledonous sequenced genomes. *BMC Plant Biol* 9:22-36.
- Hamel F, Bellemare G (1995) Characterization of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1263:212–220.
- Henrissat BI; Bairoch A (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J*, 293:781-788.
- Knight VI, Wang H, Lincoln J-E, Lulai EC, Gilchrist DG, Bostock RM (2001) Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59:277–286.

- Koga D; Isogai A; Sakuda S; Matsumoto S; Susuki A; Kimura S; Ide A (1987) Specific inhibition of *Bombyx mori* chitinase by allosamidin. *Agricultural and Biological Chemistry* 51:471-476.
- Kwon HK, Yokoyama R, Nishitani K (2005) A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of Arabidopsis suspension cultured cells. *Plant Cell Physiol.*, 46:843-857.
- Lee B, Jung W, Lee B, Avice J, Ourry A, Kim T, (2008) Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Physiologia Plantarum*, 132:329-337.
- Lin C, Mueller LA, Carthy JM, Crouzillat D, Pétiard V, Tanksley SD (2005) Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:114-130.
- Matsumoto KS (2006) Fungal chitinases. IN: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 289-304. ISBN: 81-7736-269-0 Editors: Ramón Gerardo Guevara-González and Irineo Torres-Pacheco.
- Ovtsyna AO, Dolgikh EA, Kilanova AS, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Staehelin C (2005) Nod Factors Induce Nod Factor Cleaving Enzymes in Pea Roots. *Genetic and Pharmacological Approaches Indicate Different Activation Mechanisms*. *Plant Physiol.*, 139:1051-1064.
- Ozeretskovskaya OL, Varlamov VP, Vasyukova NI, Chalenko GI, Gerasimova NG, Panina YS (2004) Influence of systemic signal molecules on the rate of spread of the immunizing effect of elicitors over potato tissues. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 40:213-216.
- Passarinho PA, Van Hengel AJ, Fransz PF, de Vries SC (2001) Expression pattern of the Arabidopsis thaliana AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. *Planta*, 212: 556-567.
- Pinheiro C, Chaves MM, Ricardo CP (2001) Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus* L. *J. Exp. Bot.*, 52:1063-1070.
- Regalado AP, Pinheiro C, Vidal S, Chaves I, Ricardo CPP, Rodrigues-Pousada C (2000) The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF-3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta*, 210:543-550.
- Rozhnova NA, Gerashchenkov GA, Babosha AV (2003) The effect of arachidonic acid and viral infection on the phytohemagglutinin activity during the development of tobacco acquired resistance. *Russ. J. Plant Physiol*, 50:661-665.
- Samac DA, Shah DM (1991) Developmental and Pathogen-Induced Activation of the Arabidopsis Acidic Chitinase Promoter. *Plant Cell*, 3:1063-1072.
- Savchenko T, Walley JW, Chehab W, Xiao Y, Kaspi R, Pye MF, Mohamed ME, Lazarus CM, Bostock RM, Dehesha K (2010) Arachidonic Acid: An Evolutionarily Conserved Signaling Molecule Modulates Plant Stress Signaling Networks. *The Plant Cell*, 22:3193-3205C.
- Sharma N; Sharma KP; Gaur RK; Gupta VK (2011) Role of chitinase in plant defense. *Asian J. Biochem.*, 6:29-37.
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: Cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, 18:207-208.
- Takakura Y, Ito T, Saito H, Inoue T, Komari T, Kuwata S (2000) Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.*, 42: 883-897.
- Tateishi Y, Umemura Y, Esaka M (2001) A Basic Class I Chitinase Expression in Winged Bean is Up-regulated by Osmotic Stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 65:1663-1668.
- Tomlin CDS (2006) *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 14th ed.; British Crop Protection Council: Surrey, UK.
- Van der Holst PP, Schlaman HR, Spink HP (2001). Proteins involved in the production and perception of oligosaccharides in relation to plant and animal development. *Curr Opin Struct Biol*, 11:608-616.
- Van Hengel AJ, Guzzo F, Van Kammen A, De Vries SC (1998) Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension culture and in developing seeds. *Plant Physiol*, 117: 43-53.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55:85-97.
- Vieira LGE, Andrade AC, Colombo CA, Moraes AHA, Metha A, Oliveira AC, Labate CA, Marino CL, Monteiro-Vitorello CB, Monte DC, *et al.* (2006) Brazilian coffee genome project: An EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18:95-108.
- Wemmer T, Kaufmann H, Kirch H-H, Schneider K, Lottspeich F, Thompson RD (1994) The most abundant soluble basic protein of the stylar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum*L.) is an endochitinase. *Planta*, 194:264-273.
- Yaldagard M, Mortazavi SA, Tabatabaie F (2007) The Effectiveness of Ultrasound Treatment on the Germination Stimulation of Barley Seed and its Alpha-Amylase Activity. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 34.
- Yeboah NA, Arahira M, Nong VH, Zhang D, Kadokura K, Watanabe A, Fukazawa C (1998) A class III acidic endochitinase is specifically expressed in the developing seeds of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) *Plant Molecular Biology*, 36:407-415.
- Yun DJ, D'Urzo MP, Abad L, Takeda S, Salzman R, Chen Z, Lee H, Hasegawa PM, Bressan RA (1996) Novel Osmotically Induced Antifungal Chitinases and Bacterial Expression of an Active Recombinant Isoform. *Plant Physiol*, 111:1219-1225.
- Zhong R, Kays SJ, Schroeder BP, Ye Z (2002) Mutation of a Chitinase-Like Gene Causes Ectopic Deposition of Lignin, Aberrant Cell Shapes, and Overproduction of Ethylene. *The Plant Cell*, 14:165-179.

