

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: michal.nowak@up.lublin.pl

MICHAŁ NOWAK

Wpływ toksycznego stężenia jonów Cu^{2+} na ekspresję genu MnSOD w roślinach pszenicy zwyczajnej, pszenżyta i żyta

The influence of toxic concentration of Cu^{2+} ions on the MnSOD gene expression in common wheat, triticale and rye plants

Streszczenie. Podstawowym mechanizmem toksycznego działania jonów miedzi na komórki roślinne jest generowanie reaktywnych form tlenu (ROS) i spowodowany tym stres oksydacyjny. Pierwszą linię obrony żywych komórek przed aktywnością ROS stanowią enzymy klasy dysmutaz ponadtlenkowych (SOD). Wzmocnienie ekspresji genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe jest jednym z najważniejszych mechanizmów obronnych żywej komórki przed stresem oksydacyjnym. Cel pracy stanowiło określenie zmian poziomu transkrypcji genu kodującego mitochondrialną manganową dysmutazę ponadtlenkową (MnSOD) w warunkach stresu abiotycznego dla trzech gatunków zbóż: pszenicy zwyczajnej, pszenżyta oraz żyta. Badania wykazały, że modyfikacja ekspresji genu MnSOD stanowi jeden z elementów odpowiedzi na stres abiotyczny spowodowany przez toksyczne działanie jonów miedzi w roślinach zbożowych, jednakże charakteryzuje ją znaczne zróżnicowanie gatunkowe.

Słowa kluczowe: mitochondrialna manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD), stres abiotyczny, pszenica zwyczajna, pszenżyto, żyto

WSTĘP

Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi stanowi jeden z najistotniejszych czynników ograniczających plonowanie zbóż na całym świecie. Niektóre metale ciężkie w niewielkich dawkach są mikroelementami niezbędnymi do prawidłowego rozwoju roślin i przebiegu wielu procesów metabolicznych, jednakże zbyt wysokie ich stężenie powoduje działanie toksyczne. Zanieczyszczenie miedzią występuje przede wszystkim na glebach uprawnych, gdzie często stosuje się pestycydy i nawozy zawierające ten metal [Fernandes i Henriques 1991].

Podstawowe toksyczne działanie jonów metali ciężkich spowodowane jest stresem oksydacyjnym związanym z generowaniem reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), a stopień uszkodzenia komórek zależy jest zarówno od ilości ROS, jak i efektywności mechanizmów detoksyfikacji i naprawy powstałych uszkodzeń [Cheng i Song 2006]. Mechanizm ochrony komórki przed działaniem reaktywnych form tlenu ma charakter kompleksowy. W pierwszym etapie dysmutazy ponadtlenkowe katalizują reakcję dysmutacji rodnika ponadtlenkowego z wytworzeniem nadtlenu wodoru. Pula powstałego H₂O₂ jest redukowana przez katalazy zlokalizowane w peroksysomach oraz przez peroksydazy zlokalizowane w wakuolach, ścianach komórkowych i mitochondriach. Enzymy te wykorzystują nadtlenek wodoru do utleniania różnych związków, zarówno organicznych, jak i nieorganicznych [Mittler 2002, Murzaeva 2004].

Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD, EC 1.15.1.1) są klasą enzymów powszechną u organizmów tlenowych i stanowią pierwszą linię obrony żywych komórek przed reaktywnymi formami tlenu [Møller 2001]. Dotychczas zidentyfikowano cztery różne typy enzymów tej klasy, różniące się budową cząsteczki i metalem występującym w centrum aktywnym. Pierwsza grupa zawiera w miejscu aktywnym jony Cu²⁺ i Zn²⁺ (Cu/ZnSOD), druga grupa jony Mn³⁺ (MnSOD), trzecia grupa jony Fe³⁺ (FeSOD), natomiast grupa czwarta parę jonów: Ni²⁺ i Ni³⁺ (NiSOD). Badania wykazały, że dysmutazy grupy Cu/ZnSOD zlokalizowane są przede wszystkim w cytozolu komórek eukariotycznych, w chloroplastach oraz w niektórych komórkach prokariotycznych, dysmutazy MnSOD – w mitochondriach oraz w komórkach organizmów prokariotycznych, dysmutazy FeSOD – przede wszystkim w komórkach organizmów prokariotycznych i glonów, a niekiedy również w chloroplastach roślin wyższych, natomiast dysmutazy NiSOD są specyficzne dla rodzaju *Streptomyces* [Fink i Scandalios 2002].

Prekursor mitochondrialnej manganowej dysmutazy ponadtlenkowej kodowany jest przez geny jądrowe, a następnie kierowany do mitochondriów. Tam zostaje przekształcony w enzym o pełnej aktywności poprzez usunięcie sekwencji kierującej, specyficznej dla mitochondrium [Bowler i in. 1989]. Fink i Scandalios [2002] dokonali porównania sekwencji aminokwasowej mitochondrialnych manganowych dysmutaz ponadtlenkowych pochodzących z różnych grup organizmów i wykazali, że stopień homologii tego białka we wszystkich organizmach żywych wynosi ponad 70%. Dokładną charakterystykę białka MnSOD pszenicy zwyczajnej przedstawili Lai i in. [2008].

Pierwsze prace dotyczące identyfikacji genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe w pszenicy lokalizowały ich loci na chromosomach grupy drugiej i określały te geny jako: Sod-A1, Sod-B1 i Sod-D1 [Neuman i Hart 1986]. Najnowsze badania wskazują, że w pszenicy zwyczajnej geny kodujące Cu/ZnSOD zlokalizowane są na długich ramionach chromosomów grupy 7, natomiast geny kodujące MnSOD znajdują się na długich ramionach chromosomów grupy 2 [Wu i in. 1999]. Mapowanie 58 EST w pszenicy zwyczajnej ujawniło pięć loci na długich ramionach chromosomów grupy drugiej, co wskazuje, że w genomie pszenicy heksaploidalnej występuje co najmniej pięć genów kodujących MnSOD [Baek i in. 2006]. Pełne zsekwencjonowanie jednego z tych genów pozwoliło na jego dokładną charakterystykę fizyczną. Gen ten ma długość 4770 nukleotydów i zawiera 6 eksonów, pomiędzy którymi znajduje się 5 fragmentów intronowych [Baek i in. 2006].

W literaturze dostępnych jest stosunkowo niewiele wyników badań dotyczących wpływu warunków stresowych na ekspresję genów kodujących dysmutazy ponadtlenko-

we w roślinach zbożowych. Większość z nich wskazuje, że wzrost ilości transkryptu MnSOD stanowi jeden z elementów mechanizmu odpowiedzi roślin na działanie stresu abiotycznego związanego z generowaniem ROS [Wu i in. 1999, Baek, Skinner 2003, 2004, Naydenov i in. 2010].

Cel pracy stanowiło określenie zmian w ilości transkryptu genu kodującego mitochondrialną manganową dysmutazę ponadtlenkową w warunkach stresu abiotycznego, spowodowanego obecnością jonów Cu^{2+} , dla trzech gatunków zbóż: pszenicy zwyczajnej, pszenżyta oraz żyta.

MATERIAŁ I METODY

Badany materiał roślinny

Przedmiot badań stanowiły polskie odmiany trzech gatunków zbóż: pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) odmiany Kris, pszenżyto (*X Triticosecale* Wittmack) odmiany Alekto oraz żyto (*Secale cereale* L.) odmiany Agrikolo. Sterylne ziarniaki badanych form wyłożono na wilgotną bibułę na szalkach Petriego i umieszczono w kiełkowniku w stałej temperaturze 25°C na 5 dni. Po tym czasie siewki przeniesiono na siatki umieszczone na kuwetach o pojemności 4 litrów w sposób zapewniający stałe zanurzenie korzeni wszystkich roślin w roztworze. W przypadku form kontrolnych korzenie roślin zanurzone były w wodzie, natomiast korzenie roślin badanych umieszczone były w roztworze CuSO_4 o stężeniu 1 mM. W trakcie trwania doświadczenia próby pobierano w pięciu punktach czasowych: po 2, 12, 24, 48 i 96 godzinach działania stresu. Próby pobierano równolegle dla form badanych i kontrolnych. Fragmenty liści natychmiast po pobraniu zamrażano w ciekłym azocie i izolowano z nich całkowite RNA.

Przygotowanie materiału do real-time PCR

Z pobranej tkanki roślinnej wyizolowano całkowite RNA, wykorzystując zestaw 'Total RNA' (A&A Biotechnology) oparty na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego [Chomczyński i Sacchi 1987]. Izolację wykonano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta zestawu. Dobrą jakość wyizolowanych preparatów RNA i ich przydatność do dalszych analiz potwierdzono poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Wyizolowane RNA (200 ng) wykorzystano jako matrycę w reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) w celu uzyskania komplementarnego DNA (cDNA). RT-PCR wykonano z zastosowaniem zestawu odczynników 'TaqMan Reverse Transcription Reagents' (Applied Biosystems). Reakcję dla każdej z prób przeprowadzono w końcowej objętości 10 μl z zastosowaniem losowych starterów heksamerowych. Skład i profil termiczny zastosowane w reakcji odwrotnej transkrypcji były zgodne z sugerowanymi przez producenta zestawu. Po zakończeniu RT-PCR każdą z próbek rozcieńczono pięciokrotnie.

Opracowanie starterów do real-time PCR

W celu zaprojektowania starterów do reakcji ilościowego PCR wykorzystano oprogramowanie Primer3Plus [Untergasser i in. 2007]. Jako matrycę wykorzystano kompletną sekwencję mRNA genu mitochondrialnej manganowej dysmutazy ponadtlenkowej pszenicy zwyczajnej (rekord TAU72212). Sekwencje opracowanych starterów prezentuje tabela 1.

Tabela 1. Sekwencje starterów zaprojektowanych do real-time PCR dla genu MnSOD
 Table 1. Sequences of primers designed for real-time PCR for MnSOD gene

Starter Primer	Sekwencja 5'-3' Sequence 5'-3'
MnSOD-F	GAGGGTGCTTTACAAGG
MnSOD-R	TGCAGGTAGTACGCATGCTC

Analiza ekspresji genu MnSOD

Analizę ekspresji genu mitochondrialnej manganowej dysmutazy ponadtlenkowej przeprowadzono z zastosowaniem metody real-time PCR w formie eksperymentu porównawczego, w którym dokonano porównania ilości transkryptu w próbach badanych w stosunku do odpowiednich form kontrolnych. Jako system detekcji wykorzystano barwnik fluorescencyjny SYBR Green I, dodatkowo zastosowano barwnik referencyjny ROX. Do przygotowania reakcji zastosowano zestaw odczynników 'Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix' (Stratagene), jako matryca zastosowane zostało cDNA (500 ng) uzyskane we wcześniejszym etapie. Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 15 μ l, a jej skład przedstawiono w tabeli 2. Jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) [Schweizer 2008].

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w analizach ekspresji genu MnSOD
 Table 2. Composition of reaction mixture used in MnSOD gene expression analyses

Składnik Component	Stężenie w próbce Concentration in sample
Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix	1 \times
Primer F	400 nM
Primer R	400 nM
ROX	30 nM
cDNA	500 ng

Każda próba analizowana była w trzech powtórzeniach technicznych. Reakcje przeprowadzono, stosując aparat Mx3005P (Stratagene). W reakcjach zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja – 10 min, 95°C, 45 cykli: 95°C – 30 s, 55°C – 1 min, 72°C – 30 s. Poziom fluorescencji SYBR Green odnotowywany był w każdym cyklu po zakończeniu etapu annealingu starterów. Specyficzność reakcji potwierdzono na podstawie analizy krzywej dysocjacji powstałych produktów. Do analizy i obróbki wyników zastosowano oprogramowanie MxPro (Stratagene).

Analizy statystyczne

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w reakcji real-time PCR wykonano zgodnie z procedurą podaną przez Yuan i in. [2006], która oparta jest na analizie istotności różnic pomiędzy wartościami ΔC_T uzyskanymi dla formy kontrolnej, w porównaniu z formą badaną. Zastosowano do tego celu nieparametryczny test Wilcoxon, a wnioskowanie oparto na *P*-wartości, na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Do analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie SAS 9.2 (SAS Institute).

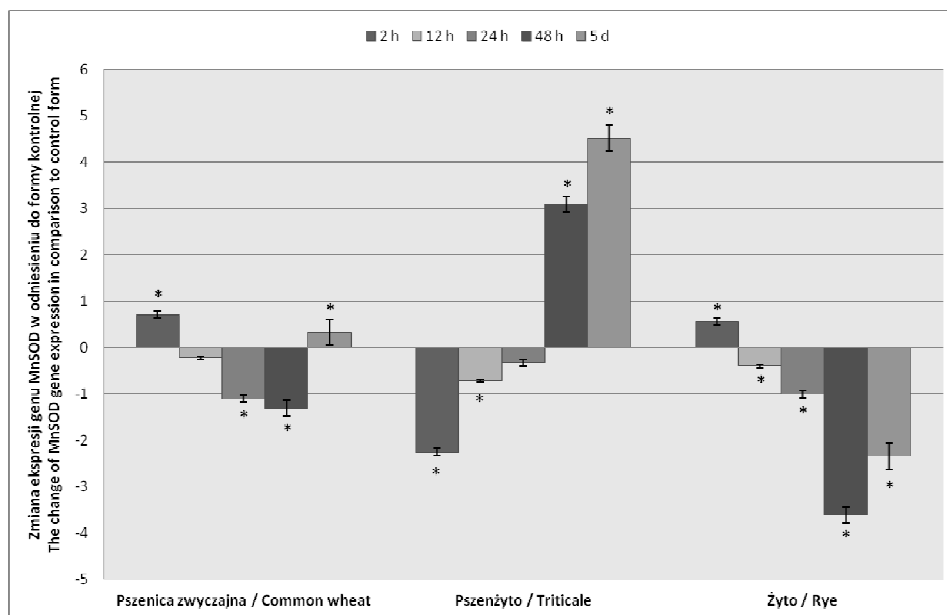
WYNIKI

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że ekspresja genu kodującego mitochondrialną manganową dysmutazę ponadtlenkową zmieniała się w warunkach stresu spowodowanego obecnością jonów Cu^{2+} . Zmiany odnotowano dla wszystkich badanych form. Schemat reakcji na czynnik stresowy w przypadku pszenicy zwyczajnej i żyta był podobny, jednak znacznie różnił się on od reakcji obserwowanej dla pszenżyta.

W przypadku pszenicy zwyczajnej i żyta w początkowej fazie działania stresu obserwowano niewielki wzrost ekspresji analizowanego genu – odpowiednio $0,7\times$ i $0,56\times$ w porównaniu z formami kontrolnymi w próbach pobranych po 2 godzinach eksperymentu. Jednakże wraz z przedłużającym się działaniem czynnika stresowego u obu tych gatunków odnotowano stopniowy spadek ilości transkryptu genu MnSOD w tkance. W przypadku zarówno pszenicy zwyczajnej, jak i żyta najniższy poziom ekspresji badanego genu odnotowano po 48 godzinach wzrostu roślin w obecności jonów miedzi. Ilość transkryptu genu MnSOD w tkance była wówczas mniejsza w odniesieniu do odpowiednich form kontrolnych niepoddanych działaniu stresu $1,31\times$ w przypadku pszenicy oraz $3,61\times$ w przypadku żyta. Następnie poziom ekspresji analizowanego genu stopniowo wzrastał i po 5 dniach w przypadku żyta był niższy od formy kontrolnej $2,34\times$, natomiast dla pszenicy przewyższył wartość odnotowaną dla kontroli $0,33\times$ (rys. 1).

Rys. 1. Średnia zmiana ekspresji genu MnSOD na poziomie transkrypcji spowodowana stresem abiotycznym (1 mM CuSO_4) w roślinach pszenicy zwyczajnej, pszenżyta i żyta

Fig. 1. The mean change of MnSOD gene expression on transcription level caused by abiotic stress (1 mM CuSO_4) in common wheat, triticale and rye plants



* różnica istotna statystycznie przy $\alpha = 0,05$

* difference statistically significant at $\alpha = 0.05$

Reakcja na warunki stresu abiotycznego spowodowanego obecnością jonów miedzi odnotowana dla pszenżyta znacząco różniła się od schematu opisanego dla pszenicy zwyczajnej i żyta. Rośliny pszenżyta zareagowały na pojawienie się jonów Cu^{2+} szybko i silną zmianą ekspresji genu MnSOD. W początkowym etapie ilość transkryptu badanego genu uległa obniżeniu ($2,26\times$ w porównaniu z formą kontrolną po 2 godzinach). Następnie jednak doszło do stopniowego wzmacniania ekspresji i już po 48 godzinach była ona ponadtrzykrotnie większa niż odnotowana dla formy kontrolnej. W kolejnych dniach ekspresja genu MnSOD ulegała dalszemu wzmocnieniu i po 5 dniach osiągnęła w tkankach roślin poddanych działaniu stresu wartość $4,5\times$ większą niż w przypadku formy kontrolnej (rys. 1).

DYSKUSJA

Uzyskane wyniki badań wskazują, że dla wszystkich analizowanych gatunków modyfikacja ekspresji genu kodującego mitochondrialną manganową dysmutazę ponadtlenkową jest jednym z elementów odpowiedzi na stres abiotyczny spowodowany przez jony metali ciężkich. Reakcja dysmutacji rodnika ponadtlenkowego stanowi jeden z pierwszych etapów kaskady procesów prowadzących w rezultacie do detoksyfikacji ROS. W związku z tym wzmocnienie ekspresji genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe, w tym MnSOD, stanowi bardzo istotny czynnik decydujący o aklimacji rośliny do niekorzystnych warunków środowiska. Porównanie schematów reakcji uzyskanych dla różnych gatunków roślin zbożowych sugeruje, iż istnieją pomiędzy nimi istotne różnice w zakresie adaptacji do wzrostu i rozwoju w warunkach stresu abiotycznego związanego z generowaniem reaktywnych form tlenu. Analiza wyników wskazuje, że u wszystkich badanych form, po początkowym spadku ilości transkryptu genu MnSOD, nastąpił stopniowy wzrost jego ilości. Tego typu schemat reakcji wskazywać może na stopniowe przystosowanie procesów fizjologicznych na poziomie komórkowym do warunków stresu, w którym roślina się znalazła.

Wyniki badań sugerują, że aklimacja roślin pszenżyta do warunków stresowych spowodowanych obecnością jonów Cu^{2+} przebiega szybciej niż roślin pszenicy zwyczajnej czy żyta. Już po 48 godzinach działania czynnika stresowego ilość transkryptu badanego genu trzykrotnie przewyższała wartość odnotowaną dla formy kontrolnej. Świadczyć to może o bardzo wysokiej skuteczności molekularnych mechanizmów reakcji na stres oksydacyjny związany z pojawieniem się ROS. W tkankach roślin pszenicy dopiero w próbie pobranej po 5 dniach eksperymentu zaobserwowano wzrost ekspresji genu MnSOD powyżej wartości uzyskanej dla kontroli, natomiast w roślinach żyta nawet po tym czasie jej poziom wciąż był znacząco niższy niż w kontroli. Może to sugerować, że gatunki te wymagają znacznie dłuższej aklimacji do warunków stresowych spowodowanych obecnością jonów metali ciężkich w glebie.

Luo i in. [2011] scharakteryzowali zmiany ekspresji genów kodujących dysmutazy ponadtlenkowe *Lolium perenne* w warunkach stresu spowodowanego obecnością kadmu. Wyniki ich badań wykazały, że ekspresja genu MnSOD ulegała w warunkach stresowych początkowemu wzmocnieniu, a następnie obniżeniu do wartości niższych niż odnotowane dla kontroli. Profil ekspresji zbliżony był do uzyskanego w badaniach własnych dla pszenicy i żyta. Analogiczna reakcja polegająca na początkowym wzmocnieniu, a następnie spadku ilości transkryptu genu MnSOD obserwowana była także w ro-

ślinach grochu w rezultacie traktowania jonami glinu [Panda i Matsumoto 2010]. Podobny profil ekspresji genu MnSOD opisany został także dla roślin pszenicy poddanych działaniu innego czynnika stresowego powodującego powstawanie reaktywnych form tlenu – temperatury obniżonej do 4°C [Naydenov i in. 2010].

Baek i Skinner [2003] scharakteryzowali zmiany ilości transkryptu genu MnSOD w pszenicy zwyczajnej w długim okresie działania chłodu. Wyniki tych badań wykazały, że rośliny pszenicy wykazywały wzmocnioną ekspresję badanego genu w okresie od 1 do 4 tygodni od momentu umieszczenia ich w niskiej temperaturze. Sugeruje to, że po wahanach ilości transkryptu genu MnSOD w pierwszych kilku dniach działania stresu oksydacyjnego następuje ustalenie ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne na podwyższonym poziomie w stosunku do form kontrolnych, co zabezpiecza roślinę przed toksycznym działaniem ROS.

Wyniki badań własnych, jak również prezentowanych w cytowanych publikacjach wskazują na konstytutywny mechanizm reakcji roślin na stres oksydacyjny na poziomie zmian w ekspresji genu MnSOD, jednakże tempo aklimacji i przystosowania procesów fizjologicznych do niekorzystnych warunków środowiska jest różne. Przeprowadzone badania wykazały, że rośliny pszenżyta mogą być potencjalnie mniej wrażliwe na zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi niż pszenicy zwyczajnej i żyta, lecz potwierdzenie tej hipotezy wymaga analizy ekspresji i aktywności także innych enzymów zaangażowanych w procesy detoksyfikacji ROS.

WNIOSKI

1. W roślinach zbożowych modyfikacja ekspresji genu kodującego mitochondrialną manganową dysmutazę ponadtlenkową stanowi jeden z elementów odpowiedzi na stres abiotyczny spowodowany przez toksyczne działanie jonów miedzi.

2. Zmiany ekspresji genu MnSOD w tkankach roślinnych pod wpływem stresu abiotycznego spowodowanego działaniem jonów metali ciężkich charakteryzuje zróżnicowanie gatunkowe.

3. W warunkach stresu abiotycznego spowodowanego aktywnością jonów Cu^{2+} wzmocnienie ekspresji genu MnSOD w roślinach pszenżyta następuje wcześniej niż w roślinach pszenicy zwyczajnej czy żyta, co wskazywać może na mniejszą wrażliwość tego gatunku na stres abiotyczny tego rodzaju.

PIŚMIENNICTWO

- Baek K.H., Skinner D.Z., 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 165, 1221–1227.
- Baek K.H., Skinner D.Z., 2004. Quantitative real-time PCR method to detect changes in specific transcript and total RNA amounts. *Electron. J. Biotechnol.* 7(1), 55–60.
- Baek K.H., Skinner D.Z., Ling P., Chen X., 2006. Molecular structure and organization of the wheat genomic manganese superoxide dismutase gene. *Genome* 49, 209–218.
- Bowler C., Alliotte T., Van Den Bulcke M., Bauw G., Vandekerckhove J., Van Montagu M., Inze D., 1989. A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3237–3241.

- Cheng H.Y., Song S.Q., 2006. Species and organ diversity in the effects of hydrogen peroxide on superoxide dismutase activity *in vitro*. *J. Integr. Plant Biol.* 48(6), 672–678.
- Chomczyński P., Sacchi N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Fernandes J.C., Henriques F.S., 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57(3), 246–273.
- Fink R.C., Scandalios J.G., 2002. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch. Biochem. Biophys.* 399(1), 19–36.
- Lai L.S., Chang P.C., Chang C.T., 2008. Isolation and characterization of superoxide dismutase from wheat seedlings. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8121–8129.
- Luo H., Li H., Zhang X., Fu J., 2011. Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology* 20, 770–778.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Møller M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561–591.
- Murzaeva S.V., 2004. Effect of heavy metals on wheat seedlings: activation of antioxidant enzymes. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40(1), 98–103.
- Naydenov N.G., Khanam S., Siniuskaya M., Nakamura C., 2010. Profiling of mitochondrial transcriptome in germinating wheat embryos and seedlings subjected to cold, salinity and osmotic stresses. *Genes Genet. Syst.* 85, 31–42.
- Neuman P.R., Hart G.E., 1986. Genetic control of the mitochondrial form of superoxide dismutase in hexaploid wheat. *Biochem. Genet.* 24(5–6), 435–446.
- Panda S.K., Matsumoto H., 2010. Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. *Biometals* 23, 753–762.
- Schweizer P., 2008. Tissue-specific expression of a defence-related peroxidase in transgenic wheat potentiates cell death in pathogen-attacked leaf epidermis. *Mol. Plant Pathol.* 9(1), 45–57.
- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A.M., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, W71–W74.
- Wu G., Wilen R.W., Robertson A.J., Gusta L.V., 1999. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol.* 120, 513–520.
- Yuan J.S., Reed A., Chen F., Neal Stewart Jr C., 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85.

Summary. The basic mechanism of the toxic effect of copper ions on plant cells is reactive oxygen species (ROS) generation and oxidative stress. The first line of live cells defense against ROS is superoxide dismutase (SOD) enzymes class. Enhancement of the expression of superoxide dismutases encoding genes is one of the main mechanisms of live cell defense against oxidative stress. The aim of the paper was determination of the changes in mitochondrial manganese superoxide dismutase gene transcription level during abiotic stress for three crops: common wheat, triticale and rye. The studies showed that modification of the MnSOD gene expression is a part of response to abiotic stress caused by toxic copper ions activity in cereals. However, significant differences between analyzed species were noticed.

Key words: mitochondrial manganese superoxide dismutase (MnSOD), abiotic stress, common wheat, triticale, rye