

Piotr Mirosław Szulc, Lucyna Drozdowska

Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, Wydział Rolniczy, Katedra Fizjologii Roślin

## Wpływ siarki na zawartość glukozynolanów w siewkach rzepaku jarego Star

### The effect of sulphur on glucosinolate content in seedlings of spring oilseed rape Star

Słowa kluczowe: rzepak jary, siewki, kultury in vitro, siarka, glukozynolany indolowe, glukozynolany alkenylowe

W celu określenia wpływu siarki na zawartość i przemiany glukozynolanów w początkowych etapach ontogenezy rzepaku jarego przeprowadzono doświadczenie w kontrolowanych warunkach kultur in vitro. Kiełkowanie nasion oraz wzrost siewek zachodził na pożywce Murashige i Skoog'a (1962), z której wyłączono siarkę (kontrola) lub zwiększono jej poziom ( $172\text{--}767\text{ mg S-SO}_4\text{ dm}^{-3}$ ).

W trzydniowych kiełkujących nasionach dominowały glukozynolany alkenylowe (głównie progoitryna), natomiast w siewkach 9–21-dniowych glukozynolany indolowe (głównie neoglukobrassicyna). Brak lub niska zawartość siarki w pożywce przyspieszały katabolizm glukozynolanów. Wskazuje to, iż produkty hydrolizy tych związków mogą być wykorzystywane jako źródło siarki przez rozwijający się zarodek przede wszystkim w heterotroficznej fazie kiełkowania.

Key words: spring oilseed rape, seedlings, in vitro culture, sulphur, indolyl glucosinolates, alkenyl glucosinolates

The effect of sulphur on the content and turnover of glucosinolates in ontogenesis of spring oilseed rape was studied in an experiment carried out under controlled in vitro cultures.

Three-day-old germinating seeds and 6 to 21-day-old oilseed rape seedlings were studied. They were grown on the modified Murashige and Skoog medium (1962) without sulphur (control) and containing from 172 to 767 mg S-SO<sub>4</sub> dm<sup>-3</sup>. Germinated seeds and seedlings were lyophilised and homogenised and then analysed for glucosinolate content with high performance liquid chromatography (HPLC) according to EN ISO 9167-1.

Main glucosinolates in three-day-old seedlings were alkenyl glucosinolates (mainly progoitryna), whereas in 9–21 day-old seedlings indolyl glucosinolates (mainly neoglucobrassicin) predominated.

Lack of sulphur as well as its deficit in the medium in early steps of ontogenesis accelerated catabolism of glucosinolates. It suggested that products of hydrolysis of those compounds can be used as a source of sulphur by the developing embryo at a heterotrophic phase of germination.

## Wstęp

Spośród związków siarki występujących w roślinach z rodziny *Brassicaceae* na szczególną uwagę zasługują glukozynolany. Uczestniczą one między innymi w mechanizmie obronnym (Chew 1988, Schnug i Haneklaus 1995, Zhao i in. 1997,

Li i in. 1999), wpływają na wigor i zdolność regeneracyjną roślin oraz są prekursorami auksyn (Kutacek i in. 1966). Przemiany, jakim glukozynolany ulegają w ontogenezie rzepaku wskazują, iż produkty ich hydrolizy mogą być dla tej rośliny źródłem węgla, azotu i siarki (Drozdowska i Rogozińska 1981, Schnug 1989, Clossais-Besnard i Larher 1991). Niedobór siarki w podłożu powoduje obniżenie poziomu glukozynolanów, głównie alkenylowych. Większa wrażliwość glukozynolanów alkenylowych na niedobór siarki jest prawdopodobnie związana z rolą tego pierwiastka w biosyntezie metioniny, która jest ich prekursorem (Zhao i in. 1994).

Przeprowadzone doświadczenie miało na celu wykazanie wpływu siarki na kształtowanie się zawartości glukozynolanów i ich przemiany w początkowych etapach ontogenezy rzepaku, a więc podczas kiełkowania nasion i wzrostu siewek. Stałe i kontrolowane warunki kultur *in vitro*, w których prowadzono badania, wykluczyły modyfikujący wpływ czynników środowiska zewnętrznego na kształtowanie się zawartości glukozynolanów.

## Material i metody

---

Material do badań stanowiły kiełkujące nasiona i rozwijające się siewki rzepaku jarego Star. Sterylne nasiona wykładano na zmodyfikowaną mineralną pożywkę MS (Murashige i Skoog 1962) zestaloną agarem. Modyfikacja pożywki standardowej polegała na zwiększeniu zawartości siarki poprzez dodanie do soli A (azotan amonu) siarczanu amonu. Zawartość azotu w soli A pozostała na tym samym poziomie, ponieważ zwiększając udział  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , zmniejszano odpowiednio ilość  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Wszystkie sole przygotowano zgodnie z procedurą Murashige i Skoog'a (1962) w formie stężonych roztworów, z których pobierano odpowiednie ilości w celu wykonania pożywek o zróżnicowanym poziomie siarki: 0,172 g  $\text{SO}_4 \text{ dm}^{-3}$  (P I); 0,423 g  $\text{SO}_4 \text{ dm}^{-3}$  (P II); 0,511 g  $\text{SO}_4 \text{ dm}^{-3}$  (P III) oraz 0,767 g  $\text{SO}_4 \text{ dm}^{-3}$  (P IV). Pożywka kontrolna nie zawierała siarki.

Kiełkowanie nasion i wzrost siewek zachodził przez 3 tygodnie w fitotronie, w temperaturze 24°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), przy fotoperiodzie 16 h i natężeniu światła 3500 Lux. Po 3, 6, 9, 12, 15, 18 i 21 dniach wzrostu material roślinny (całe siewki) liofilizowano i homogenizowano. Zawartość glukozynolanów oznaczono w próbkach o masie 50 mg metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) według EN ISO 9167-1.

Uzyskane wyniki analizowano przy pomocy programu Statistica metodą regresji wielomianowej, poszukując dla otrzymanych relacji modeli równań wielomianowych drugiego stopnia z interakcjami.

## Wyniki

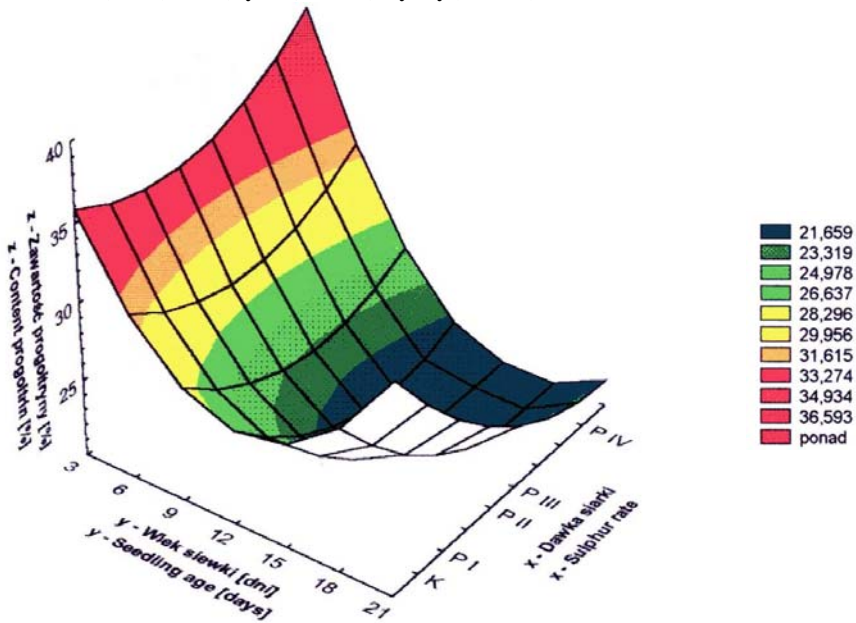
Zastosowane jako materiał wyjściowy do badań nasiona rzepaku zawierały 10,096  $\mu\text{mol g}^{-1}$  s.m. glukozynolanów. W ciągu trzech pierwszych dni kiełkowania poziom glukozynolanów ulegał gwałtownemu obniżeniu. W trzydniowych kiełkujących nasionach, w zależności od wariantu doświadczenia, całkowita zawartość glukozynolanów wynosiła od 3,055 do 5,877  $\mu\text{mol g}^{-1}$  s.m. (tab. 1). Najszybciej katabolizm glukozynolanów zachodził w nasionach, które kiełkowały na pożywce pozbawionej siarki i na pożywce P I. W kolejnych trzech dniach kultury, bez względu na rodzaj pożywki, stwierdzono dalsze obniżenie poziomu glukozynolanów. W siewkach 9–12-dniowych poziom glukozynolanów zwiększył się, przy czym w siewkach, które rozwijały się na pożywce P II zawartość badanych metabolitów była wyższa niż w materiale wyjściowym (10,115  $\mu\text{mol g}^{-1}$  s.m.). Powiększaniu się organów siewek towarzyszyło ponowne obniżenie zawartości glukozynolanów, a tempo ich rozpadu zależało od zawartości siarki w pożywce. W siewkach 21-dniowych zawartość glukozynolanów kształtowała się na poziomie 1,512 – 3,9  $\mu\text{mol g}^{-1}$  s.m. (tab. 1).

Tabela 1  
Kształtowanie się zawartości glukozynolanów w siewkach rzepaku jarego odmiany Star  
*Glucosinolate content in seedlings of spring oilseed rape 'Star'*

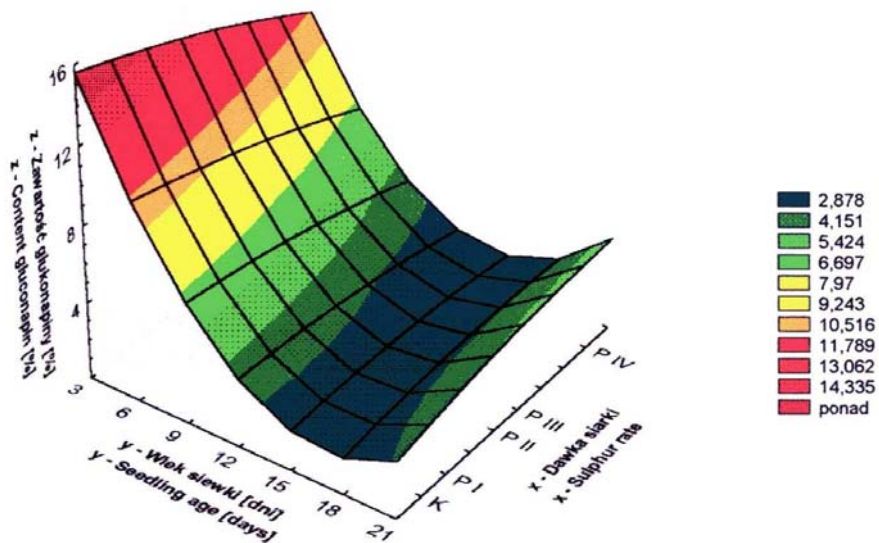
Wiek siewek <i>Seedlings age</i> [dni — <i>days</i> ]	Zawartość sumy glukozynolanów — <i>Total glucosinolate content</i> [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ s.m.]				
	Kontrola <i>Control</i>	P I	P II	P III	P IV
3	3,506	3,055	5,877	5,877	3,934
6	2,729	2,804	2,024	2,024	2,806
9	2,734	4,001	3,051	3,051	2,432
12	3,861	6,072	10,115	10,115	7,698
15	5,256	5,812	5,753	5,753	5,653
18	3,181	5,212	4,641	4,641	5,945
21	1,512	3,900	2,705	2,705	2,391

Obecność siarki i jej stężenia w pożywce wpływały na tempo przemian glukozynolanów alkenylowych i indolowych. Spośród oznaczonych glukozynolanów alkenylowych w kiełkujących nasionach i siewkach stwierdzono najwięcej progoitryny. Analiza regresji wielomianowej dla tego glukozynolanu wykazała interakcję między wiekiem siewek a stężeniem siarki w pożywce. Zawartość progoitryny w okresie 21 dni wzrostu siewek uległa w nich obniżeniu w porównaniu do jej zawartości w 3-dniowych skiełkowanych nasionach (rys. 1a).

a)  $z = 42,3 - 1,1x - 8,3y + 0,6x^2 - 0,5xy + y^2, R = 0,671$

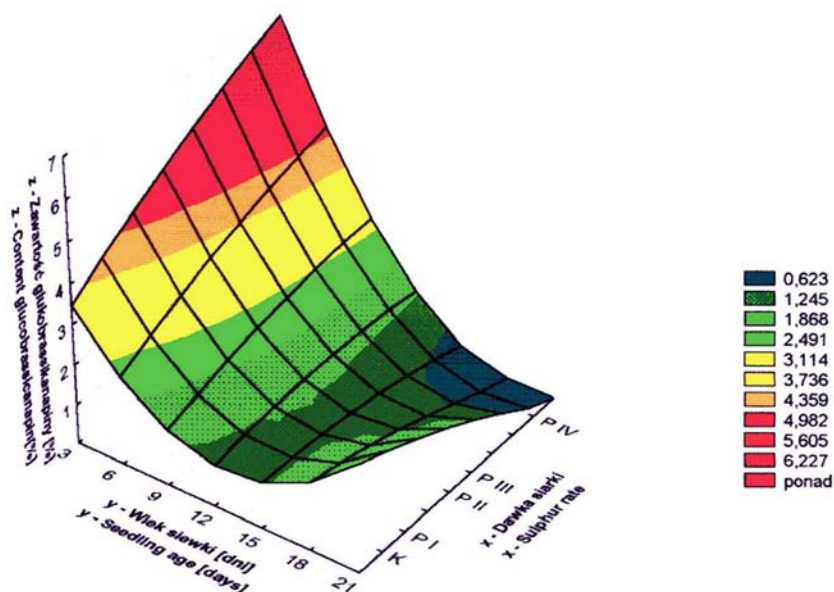


b)  $z = 21,6 - 1,3y - 0,1x^2 + 0,3xy + 0,6y^2, R = 0,913$



Rys. 1a i 1b. Zawartość progoitryny (a) i glukonapiny (b) w siewkach rzepaku Star w zależności od stężenia siarki w pożywce i czasu inkubacji — *Content of progoitrin (a) and gluconapin (b) in the seedlings of spring oilseed rape Star depending on sulphur concentration in culture medium and time of incubation*

c)  $z = 5,8 + 1,1x - 2,1y - 0,1x^2 - 0,2xy + 0,2y^2$ ,  $R = 0,852$



Rys. 1c. Zawartość glukobrassicinapiny w siewkach rzepaku Star w zależności od stężenia siarki w pożywce i czasu inkubacji — *Content of glucobrassicinapin in the seedlings of spring oilseed rape Star depending on sulphur concentration in culture medium and time of incubation*

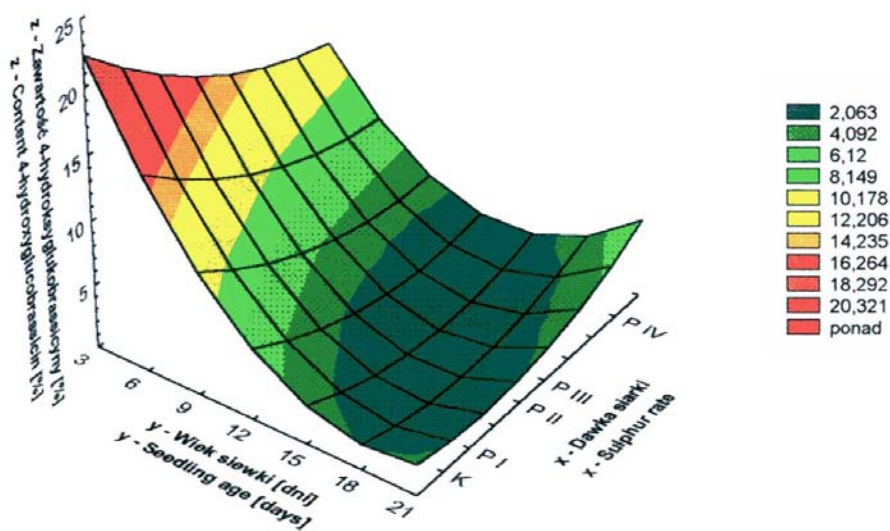
Najniższą koncentrację glukonapiny — drugiego pod względem ilościowym glukozynolanu obecnego w siewkach stwierdzono w 21 dniu ich rozwoju na pożywce P IV (rys. 1b).

Podobnie obniżała się zawartość glukobrassicinapiny. Siewki rosnące na pożywkach kontrolnej oraz P I i P II zawierały najmniej badanego związku w osiemnastym dniu inkubacji. Natomiast w przypadku wyższych stężeń siarki w pożywkach (P III i P IV) najmniej glukobrassicinapiny stwierdzono w 21-dniowych siewkach (rys. 1c).

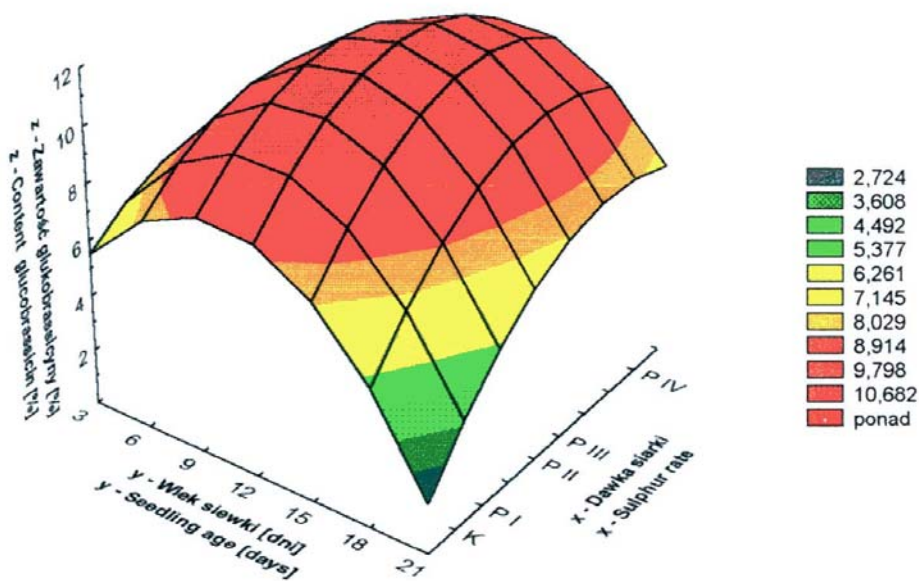
Spośród glukozynolanów indolowych, w analizowanym materiale roślinnym dominowała neoglukobrassicyna. W doświadczeniu zaobserwowano wzrost jej zawartości wraz z wiekiem siewki, co potwierdziła analiza regresji. W 21-dniowych siewkach procentowy udział neoglukobrassicyny w całkowitej puli glukozynolanów zwiększał się wraz ze wzrostem stężenia siarki w pożywce (rys. 2d).

W doświadczeniu wykazano, iż zawartość 4-hydroksyglukobrassicyny ulegała istotnemu obniżeniu w miarę wzrostu siewek. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy ilością siarki w pożywce a zawartością 4-hydroksyglukobrassicyny w rozwijających się siewkach (rys. 2a).

a)  $z = 28,5 - 4,8x - 9,1y + 0,4x^2 + 0,6xy + 0,8y^2, R = 0,882$

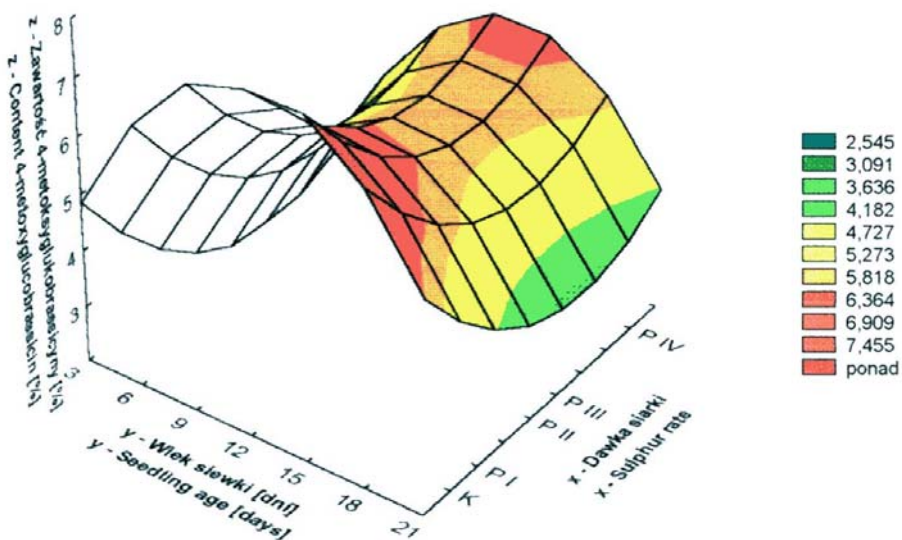


b)  $z = 3,2 + 2,2x + 3,7y - 0,8x^2 - 0,2xy - 0,5y^2, R = 0,760$

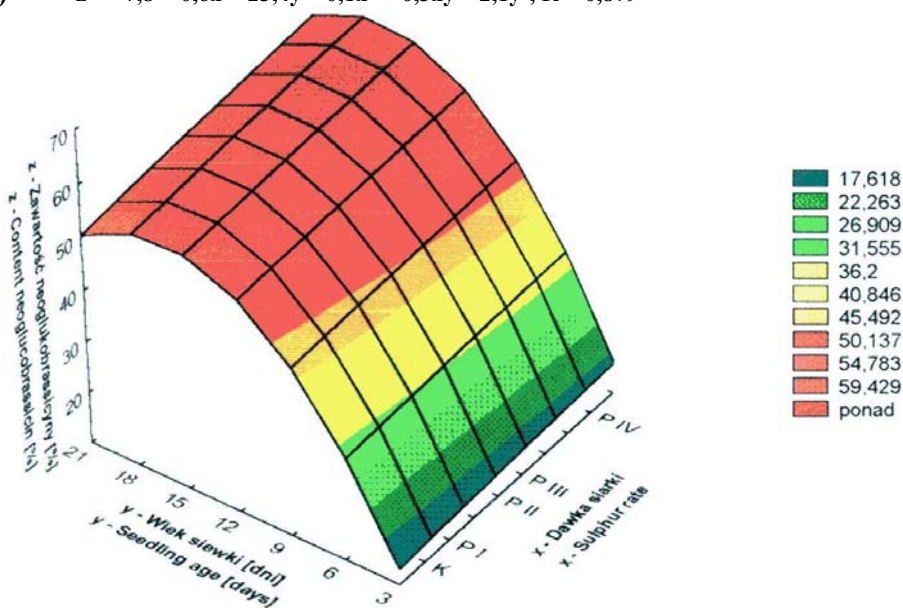


Rys. 2a i 2b. Zawartość 4-hydroksyglukobrazyliny (a) i glukobrazyliny (b) w siewkach rzepaku Star w zależności od stężenia siarki w pożywce i czasu inkubacji — *Content of 4-hydroxyglucobrassicin (a) and glucobrassicin (b) in the seedlings of spring oilseed rape Star depending on sulphur concentration in culture medium and time of incubation*

c)  $z = 0,6 - 1,1x + 3,6y + 0,3x^2 - 0,4y^2$ ,  $R = 0,621$



d)  $z = -7,8 + 0,6x + 23,4y - 0,1x^2 + 0,3xy - 2,1y^2$ ,  $R = 0,879$



Rys. 2c i 2d. Zawartość 4-metoksyglukobrassicyny (c) i neoglukobrassicyny (d) w siewkach rzepaku Star w zależności od stężenia siarki w pożywce i czasu inkubacji — *Content of 4-methoxyglucobrassicin (c) and neoglucobrassicin (d) in the seedlings of spring oilseed rape Star depending on sulphur concentration in culture medium and time of incubation*

Analizując kształtowanie się poziomu glukobrassicyny w siewkach rzepaku zaobserwowano powolny wzrost jej zawartości w miarę upływu czasu inkubacji na pożywkach o zróżnicowanych zawartościach siarki. Najwyższą zawartość glukobrassicyny stwierdzono w 12-dniowych siewkach rosnących na pożywce P II. Dalszemu wzrostowi siewek towarzyszyło obniżenie zawartości tego glukozynolanu (rys. 2b).

Najwięcej 4-metoksyglukobrassicyny zawierały 12–15-dniowe siewki rozwijające się na pożywkach P I i P II, a jej ilość zmniejszyła się wraz z wiekiem siewki. Najniższą procentową zawartość 4-metoksyglukobrassicyny stwierdzono w 21-dniowych siewkach rosnących na pożywce P II i kontrolnej (rys. 2c).

## Dyskusja

---

Podczas ontogenezy rzepaku, w różnych tkankach, skład ilościowy i jakościowy glukozynolanów ulega dynamicznym zmianom, które są efektem zachodzącej *de novo* biosyntezy, degradacji i uruchamiania tych związków. W okresie kiełkowania nasion i wzrostu młodych siewek rzepaku zachodzi katabolizm glukozynolanów, a tempo i kierunek tych przemian zależą od genotypu, i są dodatkowo modyfikowane czynnikami środowiska (Drozdowska i Rogozińska 1981, McGregor 1988).

W badanych siewkach rzepaku zawartość wszystkich analizowanych glukozynolanów ulegała gwałtownemu obniżeniu do 9 dnia kultury, a tempo tego procesu zależało od obecności siarki i jej stężenia w pożywce. Rozpad glukozynolanów w okresie pierwszych trzech dni kiełkowania nasion na pożywkach zawierających siarkę był spowolniony, natomiast brak siarki w pożywce lub bardzo niskie jej stężenie przyspieszało ten proces. Dane literaturowe wskazują, iż związki te dla rozwijających się roślin mogą być źródłem azotu, węgla, a przede wszystkim siarki (Drozdowska i Rogozińska 1981, Schnug 1989, Clossais-Besnard i Larher 1991). Kachlicki (1989) analizując zawartość glukozynolanów w kiełkujących nasionach oraz młodych siewkach rzepaku jarego stwierdził spadek zawartości glukozynolanów w pierwszych dwóch dniach kiełkowania nasion, a następnie stopniowe zwiększanie ich zawartości. W trakcie kolejnych dni trwania doświadczenia zaobserwował znaczne zróżnicowanie zawartości poszczególnych glukozynolanów w różnych częściach rośliny. Clossais-Besnard i Larher (1991) wykazali, iż w pęczniących i kiełkujących nasionach gwałtownie spada poziom glukozynolanów alkenylowych, a procesowi temu towarzyszy synteza *de novo* glukozynolanów indolowych.

W niniejszych badaniach wykazano, iż w 9–15-dniowych siewkach rzepaku zachodziła akumulacja glukozynolanów, natomiast dalszy rozwój siewek związany był z ponownym obniżeniem ich poziomu. Niższa zawartość glukozynolanów w starszych siewkach rzepaku jarego mogła być efektem rozcieńczenia, powodo-



wanym powiększaniem się organów siewek, głównie elongacji hypokotyli i rozwojem liścieni (Kachlicki 1989, McGrath i Zhao 1996, Ahmad i in. 1999). W tym stadium ontogenezy zróżnicowanie zawartości siarki w pożywkach nie miało już wpływu na zwiększenie poziomu glukozynolanów, ponieważ aplikowana siarka mogła być wykorzystywana do syntezy innych związków tworzących się w fazie anabolicznej kiełkowania. Potwierdzają to badania Rodrigues i Rosy (2000), którzy wykazali, iż w 14-dniowych siewkach, rosnących w warunkach 12-godzinnego fotoperiodu, zawartość siarki w pożywce nie różnicowała poziomu glukozynolanów. Z kolei w ciemności, przy ograniczonych procesach metabolicznych, obserwowano różnice w zawartości glukozynolanów wynikające z obecności siarki w pożywce.

Spośród oznaczonych w siewkach rzepaku glukozynolanów alkenylowych przez cały okres trwania doświadczenia dominowała progoitryna. Dominującym glukozynolanem indolowym była natomiast neoglukobrassicyna, a zwiększenie się jej zawartości w 9–15-dniowych siewkach mogło być związane z rozwojem systemu korzeniowego oraz wydłużeniem hypokotyli. Podczas formowania się poszczególnych organów siewek rzepaku zmienia się w nich skład i ilość glukozynolanów. Przeprowadzone przez Kachlickiego (1989) badania wykazały, iż w hypokotylach oraz korzeniach trzytygodniowych siewek dominuje neoglukobrassicyna, która stanowi od 80 do 90% całkowitej puli glukozynolanów, natomiast w liścieniach całkowita zawartość glukozynolanów jest bardzo niska, niemniej glukozynolany alkenylowe mogą stanowić około 26%.

Zasadniczą cechą odmian podwójnie ulepszonych rzepaku w porównaniu z odmianami wysokoglukozynolanowymi jest dominacja w nich glukozynolanów indolowych w częściach nadziemnych siewek (Kachlicki 1989). Jak wykazano w niniejszej pracy, zwiększenie poziomu siarki w pożywce wpłynęło na zwiększenie zawartości glukozynolanów indolowych w siewkach rzepaku. McGregor (1988) zaobserwował, że siarka zawarta w pożywkach stymulowała powiększanie liścieni siewek rzepaku. Przejęcie przez nie funkcji organów fotosyntetyzujących było związane ze wzrostem poziomu glukobrassicyny, z której mogą być syntetyzowane inne glukozynolany indolowe (McDanell i in. 1988). W wyniku hydroksylacji glukobrassicyny powstaje 4-hydroksyglukobrassicyna, a w wyniku metylacji neoglukobrassicyna i 4-metoksyglukobrassicyna (Fahey i in. 2001).

Wyniki doświadczenia wskazują, iż glukozynolany podlegają przemianom w okresie kiełkowania, heterotroficznej fazy wzrostu, jak również w okresie, gdy roślina przechodzi na autotroficzny sposób odżywiania. Tempo ich rozpadu, uzależnione od obecności siarki w pożywce i wzrostu rośliny wskazuje, że produkty rozpadu mogą być wykorzystywane przez rozwijającą się siewkę, zwłaszcza w okresie fazy heterotroficznej. Dyskusyjne jest natomiast wykorzystanie glukozynolanów jako źródła siarki w fazie anabolicznej kiełkowania. Stwierdzone obniżenie poziomu glukozynolanów w starszych siewkach, którego nie różnicowała zawar-

tość siarki w podłożu, wydaje się potwierdzać opinie innych autorów o efekcie rozcieńczenia (Kachlicki 1989, Wallace i Eigenbrode 2002). Z kolei w późniejszych etapach wzrostu wegetatywnego rzepaku, jak wykazali Blake-Kalff i in. (1998), siarka w największych ilościach jest akumulowana w liściach w siarczanych i te związki mogą być jej źródłem w warunkach deficytu.

## Wnioski

---

1. W kiełkujących nasionach i rozwijających się siewkach rzepaku zachodził katabolizm glukozynolanów, którego tempo zależało od zawartości siarki w pożywce.
2. Brak siarki w pożywce lub jej niska zawartość, zwłaszcza w początkowych etapach ontogenezy rzepaku w warunkach *in vitro*, przyspieszały rozpad glukozynolanów. Wskazuje to, iż produkty hydrolizy tych związków mogą być wykorzystane przez rozwijający się zarodek w heterotroficznej fazie kiełkowania.
3. W trzydniowych kiełkujących nasionach rzepaku dominowały glukozynolany alkenylowe, głównie progoitryna, natomiast w siewkach 9–21-dniowych — glukozynolany indolowe, spośród których najwięcej stwierdzono neogluko-brassicyny. Dodatkowo w starszych siewkach stosunek glukozynolanów alkenylowych do indolowych zależał od stężenia siarki w pożywce.

## Literatura

---

- Ahmad A., Abrol Y.P., Abdin M.Z. 1999. Effect of split application of sulphur and nitrogen on growth and yield attributes of *Brassica* genotypes differing in time flowering. *Can. J. Plant. Sci.*, 79 (2): 175-180.
- Blake-Kalff M.M.A., Harrison K.R., Hawkesford M.J., Zhao F.J., McGrath S.P. 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol.*, 118: 1337-1344.
- Butcher D.N., Chamberlain K., Rausch R., Searle L.M. 1984. Biochemical aspects of synthetic and naturally occurring plant growth regulators. *Plant Growth Regul. Group. Wantage Oxfordshire*: 91-101.
- Chew F.S. 1988. Biological effects of glucosinolates. W: *Biologically Active Natural Products* (Ed. H.G. Cutler), American Chemical Society Symposium, Washington DC: 155-181.
- Clossais-Besnard N., Larher F. 1991. Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *J. Sci. Food Agric.*, 56: 25-38.
- Drozdowska L., Rogozińska J. 1981. Wpływ światła i siarki na metabolizm glukozynolanów w siewkach rzepaku. *Biuletyn IHAR*, 146: 135-141.

- Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem.*, 56: 5-51.
- Kachlicki P. 1989. Analiza zawartości glukozynolanów w zielonych częściach roślin oraz w korzeniach rzepaku. *Zesz. Prob. IHAR. Rośl. Oleiste*, (1): 50-62.
- Kutacek M., Bulgakov R., Oplistolova K. 1966. On the auxin activity of glucobrassicin in biological tests. *Biol. Plant.*, 8 (3): 252-255.
- Li Y., Kiddle G., Bennett R., Doughty K., Wallsgrove R. 1999. Variation in the glucosinolate content of vegetative tissues of Chinese lines of *Brassica napus* L. *Ann. Appl. Biol.*, 134: 131-136.
- McDanell R., McLean A.E.M., Hanley A.B., Heaney R.K., Fenwick G.R. 1988. Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a review. *Food Chem. Toxicol.*, 26: 59-70.
- McGrath S.P., Zhao F.J. 1996. Sulphur uptake, yield responses and interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *J. Agric. Sci.*, 126 (1): 53-62.
- McGregor D.I. 1988. Glucosinolate content of developing rapeseed (*Brassica napus* L. Midas) seedlings. *Can. J. Plant Sci.*, 68: 367-380.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Rodrigues P.M.F., Rosa E.A.S. 2000. The role of sulfur on secondary plant metabolites: The glucosinolates. Internet: <http://www.pb.fal.de/en/cost/sia26.htm>
- Schnug E. 1989. Double low oilseed rape in West Germany: sulfur nutrition and glucosinolate level. *Aspects Appl. Biol.*, 23: 67-82.
- Schnug E., Haneklaus S. 1995. Sulphur deficiency in oilseed rape flowers-symptomatology, biochemistry and ecological impact. 9th International Rapeseed Congress, Cambridge: 296-298.
- Wallace S.K., Eigenbrode S.D. 2002. Changes in the glucosinolate – myrosinase defense system in *Brassica juncea* cotyledons during seedling development. *J. Chem. Ecol.*, 28 (2): 243-256.
- Zhao F., Evans E.J., Bilsborrow P.E., Syers J.K. 1994. Influence of nitrogen and sulphur on the glucosinolate profile of rapeseed (*Brassica napus* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 64: 295-304.
- Zhao F.J., Withers P.J.A., Evans E.J., Monaghan J., Salmon S.E., Shewry P.R., McGrath S.P. 1997. Sulphur nutrition: An important factor for the quality of wheat and rapeseed. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43: 1137-1142.