

BARBARA ŁATA, MARZENNA PRZERADZKA, JOANNA STOJANOWSKA

WPLYW NAWOŻENIA AZOTEM NA ZAWARTOŚĆ NISKOCZĄSTECZKOWYCH ZWIĄZKÓW TIOLOWYCH, ASKORBINIANU ORAZ AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW OKSYDACYJNYCH W RÓŻACH KALAFIORA I BROKUŁA

*Z Katedry Sadownictwa i Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

ABSTRACT. The effect of nitrogen fertilization on low molecular weight thiols, ascorbate, glutathione reductase and ascorbate peroxidase in edible parts of broccoli and cauliflower were investigated. Four levels of nitrogen: 40 (control group), 100, 200 and 300 mg N · dm⁻³ and two types of soil: podsol sandy soil and silty loam alluvial soil were tested. Total glutathione content increased with the increasing N level. Fertilization had no significant effect on ascorbate content. The antioxidant potential in broccoli 'Fiesta F₁' was significantly higher than cauliflower 'Latemán'.

Key words: thiol compound, ascorbate, glutathione reductase, ascorbate peroxidase, nitrogen, broccoli, cauliflower

Wstęp *

Poziom wolnych rodników w komórkach, będący konsekwencją zarówno normalnych przemian metabolicznych, jak i wywołanych niekorzystnymi czynnikami w środowisku, jest zdeterminowany w dużym stopniu pojemnością i aktywnością aparatu antyoksydacyjnego. Glutation i jego prekursorzy: cysteina i γ -glutamylcysteina oraz askorbinian, zaliczane do hydrofilowych przeciwutleniaczy, stanowią ważny element systemu obronnego komórek. Równie ważną funkcję pełnią związane z nimi enzymy: GR i APX, które są niezbędne do redukcji utlenionych form tych związków, a powstających w czasie usuwania wolnych rodników. Glutation (GSH, γ -glutamylcysteinyl-

*Stosowane skróty: CYS = cysteina, γ -GC = γ -glutamylcysteina, ASC_{tot} = suma utlenionej i zredukowanej formy askorbinianu, GSH_{tot} = GSH + GSSG, GR = reduktaza glutationowa, APX = peroksydaza askorbinianowa, CAT = katalaza, SOD = dysmutaza nadtlenkowa.

glicyna) jest składnikiem zarówno chemicznego, jak i enzymatycznego systemu obronnego działającego w cytoplazmie i chloroplastach komórek roślinnych, chroni grupy tiolowe białek przed oksydacją, a także jest induktorem genów odpowiedzialnych za ekspresję czynników defensywy antyoksydacyjnej (Coleman i in. 1997, Foyer i in. 1997). Podobnie wiele ważnych funkcji pełni kwas askorbinowy jako antyoksydant, kofaktor enzymów, donor czy akceptor elektronów (Smirnoff 1996).

Warzywa z rodziny *Cruciferae* znane są z wysokiej zawartości związków zawierających siarkę, witaminy C oraz całkowitego potencjału przeciwutleniającego i stąd zaliczane do grupy warzyw o wysokich walorach odżywczych. Skład chemiczny roślin jest uwarunkowany genetycznie (gatunki i odmiany różnią się endogennym poziomem fitozwiązków), jak i kształtowany szeregiem czynników oddziałujących na roślinę w czasie wzrostu (warunki klimatyczne, zabiegi agrotechniczne) oraz po zbiorze (długość i sposób przechowywania), czy w końcu technologią przetwarzania (Lee i Kadar 2000).

Celem niniejszej pracy była ocena zawartości niskocząsteczkowych związków tiolowych, całkowitej zawartości askorbinianu oraz współdziałających z nimi enzymów: reduktazy glutationowej i peroksydazy askorbinianowej w warunkach zróżnicowanego zaopatrzenia roślin w azot.

Material i metody

Badanie przeprowadzono w latach 2000 oraz 2001 w Katedrze Sadownictwa i Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa. Wykorzystano mikropoletki o powierzchni 1 m² oraz głębokości 1,4 m wypełnione dwoma typami gleb: płową oraz madą. Na podstawie analizy chemicznej, wykonanej metodą uniwersalną, uzupełniono azot do następujących poziomów [w mg · dm⁻³]: 40 w kombinacji kontrolnej, a następnie do 100, 200 i 300, a poziomy P i K wynosiły odpowiednio 100 i 200 mg · dm⁻³ gleby. Zastosowano następujące nawozy: NH₄NO₃ (34% N), Ca(H₂PO₄)₂ × H₂O (20% P) oraz K₂SO₄ (41,5% K). Na poletkach wysadzono rośliny brokuła odmiany 'Kermit F₁' oraz kalafior 'Lateman' na zbiór letni. Rozsadę przygotowano w szklarniach SGGW, wysadzano w trzeciej dekadzie maja na miejsca stałe, zaś zbiór rozpoczynano w pierwszej dekadzie lipca.

Próbki warzyw pobierano w okresie dojrzałości konsumpcyjnej, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano do czasu analizy w – 80°C.

Całkowitą zawartość askorbinianu oraz niskocząsteczkowych związków tiolowych (cysteiny, γ-glutamylcysteiny, całkowitą zawartość glutationu) oznaczono metodą wysokosprawną chromatografią cieczową. Tkanekę homogenizowano w ciekłym azocie i ekstrahowano 0,1 M HCl. Całkowitą zawartość glutationu i askorbinianu oznaczono po uprzedniej redukcji ich form utlenionych przy pomocy dithiothreitolu (DTT). W przypadku askorbinianu zastosowano rozdział izokratyczny, stosując 2% NH₄H₂PO₄ w 10% MeOH oraz detektor UV-VIS (Anderson i in. 1992). Dla związków tiolowych rozdział przeprowadzono w gradiencie 10 i 90% MeOH po ich uprzednim przeprowadzeniu w fluorescencyjne pochodne (Newton i in. 1987). Identyfikację i obliczenie stężenia przeprowadzono na podstawie roztworów wzorcowych oraz wprowadzanego standardu wewnętrznego. Analizy te wykonano w 4 powtórzeniach, z których każde stanowiło próbę mieszaną z 2 roślin.

Aktywność enzymów oznaczono metodami spektrofotometrii absorpcyjnej: reduktaza glutationowa – monitoring redukcji GSSG przez NADPH wyrażony spadkiem absorbancji w czasie przy długości fali 340 nm (Foyer i Halliwell 1976); peroksydaza askorbinianowa – monitoring zależnej od askorbinianu redukcji H_2O_2 , spadek absorbancji w czasie przy długości fali 290 nm (Nakano i Asada 1987). Analizy te wykonano w 8 powtórzeniach, z których każde stanowiło próbę pobraną z jednej rośliny.

Wyniki opracowano, stosując trzy-czynnikową analizę wariancji ANOVA 3 oddzielnie dla poszczególnych gleb celem określenia zmienności sezonowej, zaś do porównań średnich użyto testu Tukeya.

Wyniki

Analiza statystyczna, z wyjątkiem stężenia CYS u roślin rosnących na glebie płowej i γ -GC na madzie, wykazała istotny wpływ nawożenia azotem na zawartość niskocząsteczkowych związków tiolowych oraz aktywność GR i APX na obu poddanych badaniom glebach (tab. 1). W kombinacji kontrolnej, u roślin najgorzej zaopatrzonych w azot rosnących na madzie, odnotowano wyższą całkowitą zawartość glutationu oraz jego prekursorów, jak również wzrost aktywności enzymów oksydacyjnych w porównaniu do kombinacji, gdzie poziom azotu w glebie uzupełniono do $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Przy wyższych poziomach azotu w glebie (200 i $300 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) obserwujemy ponownie wzrost wartości tych wskaźników. Podobną reakcję wykazano dla roślin rosnących na glebie płowej, a mianowicie istotny spadek aktywności GR oraz mniej wyraźny APX oraz istotny spadek zawartości γ -GC. Natomiast zawartość GSH_{tot} rosła wraz z lepszym zaopatrzeniem roślin w azot. Ogólnie w przypadku gleby płowej, przy wyższych poziomach azotu w glebie, stężenie antyoksydantów zmieniało się bardzo różnie w zależności od ich rodzaju.

Nawożenie azotem nie wpłynęło różnicująco na stężenie ASC_{tot} , zarówno u roślin uprawianych na glebie płowej, jak i madzie. Najwyższą zawartość askorbinianu na obu rodzajach gleb uzyskano przy $100 \text{ mg N} \cdot \text{dm}^{-3}$, na madzie ok. $123 \text{ mg}\%$, zaś na glebie płowej ok. $152 \text{ mg}\%$. Najwyższe stężenie CYS ($43,6 \text{ nmol g}^{-1}$ św.m. na madzie, a na glebie płowej $50,1 \text{ nmol g}^{-1}$ św.m.) i GSH_{tot} ($228,4 \text{ nmol g}^{-1}$ św.m. na madzie i $247,4$ na glebie płowej) uzyskano przy $300 \text{ mg N} \cdot \text{dm}^{-3}$, niezależnie od typu gleby.

Generalnie poziom analizowanych związków był wyższy u roślin rosnących na glebie płowej w porównaniu z madą, jedynie aktywność enzymów oksydacyjnych, a zwłaszcza APX, kształtowała się na zbliżonym poziomie niezależnie od typu gleby.

Istotnie wyższym potencjałem przeciwutleniającym w zakresie związków tiolowych oraz aktywności reduktazy glutationowej charakteryzował się brokuł 'Fiesta F₁' w porównaniu z kalafiorem 'Lateman' (tab. 2). Endogennie wyższy poziom tych związków w brokule utrzymywał się zarówno na madzie, jak i glebie płowej. W przypadku askorbinianu zależność ta miała miejsce głównie u roślin uprawianych na madzie, zaś na glebie płowej różnica ta utrzymywała się także, była jednak nieistotna statystycznie. Aktywność APX – niezależnie od genotypu, czy gleby – utrzymywała się na zbliżonym poziomie.

Zmienność sezonowa zaznaczyła się wyraźnie tylko w przypadku roślin uprawianych na glebie płowej (tab. 3). Przede wszystkim odnotowano wysoce istotne zwiększenie

Tabela 1
Stężenie niskocząsteczkowych związków tiolowych, askorbinianu oraz aktywność GR i APX w zależności od rodzaju gleby oraz poziomu azotu
Content of antioxidant dependent on the type of soil and nitrogen level in the soil

Poziom N (mg N · dm ⁻³) N in the soil (mg · dm ⁻³) Parameter Parameter	Mada Silty loam alluvial soil				Gleba płowa Podsól sandy soil					
	kontrola control	100	200	300	średnio mean	kontrola control	100	200	300	średnio mean
	GSH _{tot} (nmol g ⁻¹ św.m.) GSH _{tot} (nmol g ⁻¹ f.w.)	195,1 ab	179,8 a	199,8 ab	228,4 b	200,8	198,7 a	228,3 ab	236,8 ab	247,4 b
CYS (nmol g ⁻¹ św.m.) CYS (nmol g ⁻¹ f.w.)	31,1 a	29,0 a	41,3 b	43,6 b	36,2	45,3 *	45,8	47,5	50,1	47,2
Y-GC (nmol g ⁻¹ św.m.) Y-GC (nmol g ⁻¹ f.w.)	4,3*	3,8	4,8	4,8	4,4	7,3 b	4,5 a	5,3 a	4,7 a	5,4
ASC _{tot} (μg g ⁻¹ św.m.) ASC _{tot} (μg g ⁻¹ f.w.)	946,1*	1 229,2	851,2	912,0	984,6	1044,3*	1 518,8	969,6	1 010,7	1135,8
GR (nkat g ⁻¹ św.m.) GR (nkat g ⁻¹ f.w.)	20,9 b	18,3 ab	17,8 a	19,1 ab	19,0	20,2 b	16,1 a	20,0 b	17,5 a	18,4
APX (nkat g ⁻¹ św.m.) APX (nkat g ⁻¹ f.w.)	51,9 ab	44,0 a	71,9 b	63,5 ab	57,8	68,8 b	65,0 b	43,3 a	53,5 ab	57,6

*brak liter oznacza, że analiza statystyczna nie wykazała wpływu wzrastających poziomów azotu w podłożu na badany wskaźnik

*lack of letters, means that statistical analysis didn't show the influence of increasing level of N in the soil on analyzed parameter

Tabela 2
Stężenie i aktywność antyoksydantów w zależności od genotypu i typu gleby (A i B)
Content of antioxidant and enzyme activity depending on the type of soil (A and B)
in broccoli 'Fiesta F₁' and cauliflower 'Lateman'

A	Mada – Silty loam alluvial soil					
	GSH _{tot}	CYS	γ-GC	ASC _{tot}	GR	APX
Odmiana Cultivar	nmol g ⁻¹ św.m. nmol g ⁻¹ f.w.			μg g ⁻¹ św.m. μg g ⁻¹ f.w.	nkat g ⁻¹ św.m. nkat g ⁻¹ f.w.	
Kalafior 'Lateman'	135,9 a	34,1*	3,7 a	610,3 a	13,9 a	60,2*
Brokuł 'Fiesta F ₁ '	265,6 b	38,3	5,2 b	1 358,9 b	24,2 b	55,4
B	Gleba płowa – Podsol sandy soil					
	GSH _{tot}	CYS	γ-GC	ASC _{tot}	GR	APX
Odmiana Cultivar	nmol g ⁻¹ św.m. nmol g ⁻¹ f.w.			μg g ⁻¹ św.m. μg g ⁻¹ f.w.	nkat g ⁻¹ św.m. nkat g ⁻¹ f.w.	
Kalafior 'Lateman'	169,7 a	41,7 a	3,6 a	1 009,9*	13,3 a	58,4
Brokuł 'Fiesta F ₁ '	285,9 b	52,7 b	7,3 b	1 261,9	23,7 b	56,9

*objaśnienia jak w tabeli 1

*explanations as in table 1.

Tabela 3
Stężenie i aktywność antyoksydantów w zależności od roku badań u roślin rosnących
na glebie płowej
Content of antioxidant and enzyme activity in plants grown on podsol sandy soil depending
on the year of the experiment

Rok Year	GSH _{tot}	CYS	γ-GC	ASC _{tot}	GR	APX
		nmol g ⁻¹ św.m. nmol g ⁻¹ f.w.			μg g ⁻¹ św.m. μg g ⁻¹ f.w.	nkat g ⁻¹ św.m. nkat g ⁻¹ f.w.
2000	224,2*	40,2 a	6,0 b	922,0*	25,9 b	76,6 b
2001	231,4	54,2 b	4,9 a	1349,7	11,0 a	38,7 a

*objaśnienia jak w tabeli 1

* explanations as in table 1.

aktywności enzymów odpowiedzialnych za utrzymanie askorbinianu i glutationu w ich aktywnych, zredukowanych formach, a także istotnie wyższe stężenie γ -GC w roku 2000. Stężenie CYS było istotnie wyższe w roku 2001, wyższa, choć nie potwierdzona statystycznie, była także zawartość ASC_{tot} i GSH_{tot}.

Rośliny rosnące na madzie, niezależnie od roku badań (jedynym wyjątkiem była aktywność GR – istotnie wyższa w roku 2000), nie różniły się istotnie zawartością antyoksydantów oraz aktywnością peroksydazy askorbinianowej (dane nie prezentowane).

Dyskusja

Ilość i jakość plonu roślin jest kształtowana zarówno przez niedobór, jak i nadmiar (zasolenie) składników mineralnych w glebie, podłożu, czy pożywce (Starck i in. 1995). Niedobory składników mineralnych powodują niestabilność błon cytoplazmatycznych, a to powoduje zmiany w ich selektywnej przepuszczalności dla jonów i produktów fotosyntezy. Uszkodzenia takie mogą być spowodowane nagromadzeniem się wolnych rodników. W aklimatyzacji roślin do niesprzyjających warunków środowiska uczestniczą hydro- i lipofilne antyoksydanty oraz enzymy oksydacyjne. Wzrost ich stężenia czy aktywności świadczy o wzmożonym zapotrzebowaniu usuwania wolnych rodników.

W niniejszych badaniach zróżnicowane zaopatrzenie roślin w azot spowodowało istotną reakcję roślin, wyrażoną zarówno zmianami w aktywności enzymów, jak i badanych antyoksydantów. Potwierdza to, że tak jak przy innych stresach, niedobór, nadmiar, czy źle zbilansowane żywienie mineralne roślin skutkuje powstawaniem wysoce reaktywnych, uszkadzających najważniejsze makromolekuły komórkowe, wolnych rodników. Wyższe stężenie związków tiolowych oraz wyższą aktywność GR i APX odnotowano w roślinach kontrolnych (ok. 40 mg N · dm⁻³ gleby) w porównaniu z kombinacją, gdzie poziom N wynosił 100 mg · dm⁻³. Dalsze zwiększanie zaopatrzenia roślin w azot (200 i 300 mg) powodowało powtórny wzrost stężenia i aktywności wspomnianych wyżej składników. Zmian tych nie można jednak ująć w jedno, jednoznaczne stwierdzenie. Badanie wpływu różnych czynników na poziom antyoksydantów jest dosyć trudne, gdyż związki te ulegają dynamicznym przemianom, gdzie nawet pora dnia może decydować o ich stężeniu. Ocenę może ułatwić zastosowanie skrajnie różnych wartości badanych czynników. W doświadczeniu zastosowano raczej stopniowy wzrost ilości N w podłożu. Logan i in. (1999) badając wpływ niedostatku N na zawartość antyoksydantów w liściach szpinaku podali, że zawartość chlorofilu, karotenoidów, ASC oraz aktywność GR i APX przedstawiona na powierzchnię liścia była istotnie niższa przy deficycie azotu w pożywce. Wskaźniki te były zbliżone, gdy wyrażono je na jednostkę chlorofilu, a wzrosły po przeliczeniu na jednostkę białka. Rośliny uprawiano, stosując jako podłoże wermikulit, nawadniając je pożywką zawierającą 0,25 mM NO₃⁻ lub 14 mM NO₃⁻ – pełne wysycenie roślin azotem.

Nawożenie nie wpłynęło istotnie na całkowitą zawartość askorbinianu. Najwyższe stężenie ASC_{tot} uzyskano przy 100 mg N · dm⁻³ gleby. Przy wyższych poziomach zasobności gleby w azot stwierdzono spadek wartości tego wskaźnika, jednak nie były to różnice istotne statystycznie. Podobnie bez wpływu pozostawało nawożenie azotem na zawartość witaminy C w zgrubieniu kalarepy (Łata i in. 2002). Natomiast istotny

wzrost zawartości tego składnika (do 200 mg N) miał miejsce w liściach. **Lisiewska i Kniecik** (1996) podają, że wzrost nawożenia azotem z 80 do 120 kg N ha⁻¹ spowodował obniżenie o 7% zawartości witaminy C w kalafiorze, natomiast był nieistotny w przypadku brokuła. Reakcja może być bardzo różna i zależeć od gatunku, warunków wzrostu. Przed i pozbiorcze czynniki modyfikujące zawartość witaminy C omawiają dość dokładnie **Lee i Kadar** (2000).

Enzymem „konsumującym” kwas askorbinowy jest APX, która katalizuje reakcję redukcji H₂O₂ do H₂O, z jednoczesnym utlenieniem zredukowanej formy ASC (**Nishikawa i in.** 2003). U roślin rosnących na mądzie aktywność tego enzymu spada wyraźnie przy 100 mg N, podczas gdy na glebie płowej ma to miejsce dopiero przy 200 mg N · dm⁻³ gleby. Wskazuje to w pewnym stopniu na potrzebę większego nawożenia tej gleby. Wzrost aktywności APX pod wpływem stresu był obserwowany przez wielu autorów (**Nishikawa i in.** 2003).

Podobnie jak deficyt składników w podłożu, również ich nadmiar powoduje redukcję biomasy roślin oraz zmiany biochemiczne i fizjologiczne. **Rios-Gonzales i in.** (2002) stwierdzają, że zasolenie (100 mM NaCl) wpłynęło na wzrost aktywności enzymów: GR, CAT, SOD w siewkach kukurydzy i słonecznika. Nie bez znaczenia była także forma zastosowanego N. Niekorzystnie na badane parametry wpłynęło żywienie roślin formą N-NH₄ w porównaniu z formą N-NO₃, jako źródłem azotu. W niniejszej pracy również ma miejsce pewna aktywizacja oznaczanych elementów systemu antyoksydacyjnego wraz z wyższą dawką N. Niemniej jednak zastosowane poziomy nie są wysokie, a w warunkach polowych raczej rzadko mamy sytuację z wysokim stężeniem soli.

Średnia zawartość ASC_{tot}, GSH_{tot} i jego prekursorów była wyraźnie wyższa w roślinach uprawianych na glebie płowej. Gleba ta, jak wiadomo, charakteryzuje się mniej korzystnymi właściwościami fizyko-chemicznymi (mniejszy kompleks sorpcyjny, pojemność wodna, mniejsza zawartość substancji organicznej), niż mada. Stąd też prawdopodobnie warunki te mogą wzmacniać reakcję na inne stresy. Otrzymane wyniki wskazują także na potrzebę dokładniejszej analizy gleb, wychodzącą poza zawartość podstawowych makroelementów, odczynu i stężenia soli. Również zmienność badanych parametrów w poszczególnych sezonach wegetacji była większa u roślin rosnących na glebie płowej. Szczególnie przejawiało się to w bardzo wysokiej aktywności APX i GR oraz istotnym wzroście γ-GC w roku 2000. Rok ten charakteryzował się dużą zmiennością ilości promieniowania całkowitego (**Gajc-Wolska i Skąpski** 2002), a mianowicie bardzo wysoką wartość miało ono w czerwcu, a następnie duży spadek w lipcu (dwóch podstawowych miesiącach wegetacji). Mogło to mieć także wpływ na zawartość ASC_{tot} w analizowanych latach (wyższa w roku 2001). Generalnie niższa intensywność światła przekłada się na obniżenie zawartości witaminy C (**Lee i Kadar** 2000, **Toledo i in.** 2003).

Brokuł ‘Fiesta F₁’ charakteryzował się wyższą zawartością związków tiolowych, askorbinianu i wyższą aktywnością GR (dla większości oznaczanych związków udowodnioną statystycznie), niż kalafior ‘Lateman’, niezależnie od rodzaju gleby, na której rosły rośliny. Jedynie aktywność APX była zbliżona u obu gatunków. Może to być dodatkowym wyjaśnieniem informacji podawanej przez podręczniki, że kalafior ma największe wymagania glebowe i klimatyczne wśród roślin kapustnych. Wiele prac podaje, że wielkość i sprawność aparatu antyoksydacyjnego może być wskaźnikiem zdolności do aklimatyzacji danego genotypu do zmieniających się niekorzystnie warunków środowiska.

Wnioski

1. Poziom zasobności gleby w azot wpłynął na ogół istotnie na zawartość niskocząsteczkowych związków tiolowych oraz aktywność enzymów: reduktazy glutationowej i peroksydazy askorbinianowej.

2. Spadek stężenia glutationu i jego prekursorów oraz aktywności badanych enzymów ma miejsce już przy $100 \text{ mg N} \cdot \text{dm}^{-3}$, zwłaszcza u roślin rosnących na madzie, co może świadczyć pośrednio, że poziom zastosowanych w tej kombinacji składników mineralnych był optymalny.

3. Nawożenie nie wpłynęło istotnie na całkowitą zawartość askorbinianu. Najwyższą jego zawartość, niezależnie od typu gleby, stwierdzono przy $100 \text{ mg N} \cdot \text{dm}^{-3}$ gleby.

4. Poza aktywnością peroksydazy askorbinianowej, rośliny uprawiane na glebie płowej charakteryzowały się wyższą pojemnością antyoksydacyjną w zakresie analizowanych parametrów, niż uprawiane na madzie. Sugeruje to mniej korzystne właściwości fizyko-chemiczne gleby płowej w porównaniu z madą.

5. Zmienność sezonowa w stężeniu i aktywności badanych antyoksydantów zaznaczyła się w sposób istotny na glebie płowej.

6. Brokuł 'Fiesta F₁' odznacza się wyższą zawartością związków tiolowych, askorbinianu oraz aktywnością reduktazy glutationowej, niż kalafior 'Lateman'.

Literatura

- Anderson J.V., Chevone B.I., Hess J.L.** (1992): Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles. *Plant Physiol.* 98: 501-508.
- Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.A., Davies T.G.M.** (1997): Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plants Sci.*: 144-151.
- Foyer C.H., Halliwell B.** (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M.** (1997): Hydrogen peroxide – and glutathione – associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.
- Gajc-Wolska J., Skąpski H.** (2002): Yield of field grown sweet pepper depending on cultivar and growing conditions. *Folia Hort.* 14 (1): 95-103.
- Lee S.K., Kadar A.A.** (2000): Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 207-220.
- Lisiewska Z., Kmieciak W.** (1996): Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C retention. *Food Chem.* 57 (2): 267-270.
- Logan B.A., Demming-Adams B., Rosenstiel T.N., Adams III W.W.** (1999): Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidant in relationship to other metabolic characteristics. *Planta* 209: 213-220.
- Łata B., Przeradzka M., Trąmpczyńska A.** (2002). Wpływ nawożenia azotem na poziom i aktywność wybranych elementów systemu antyoksydacyjnego w zgrubieniu i liściu kalarepy odmiany 'Korist F₁'. *Rocz. AR Pozn. CCCXLI, Ogrodn.* 35: 11-18.
- Nakano Y., Asada K.** (1987): Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast, its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28: 131-140.

- Newton G.L., Dorian R., Fahey R.C.** (1987): Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reversed phase liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 111: 383-387.
- Nishikawa F., Kato M., Wang R., Hyodo H., Ikoma Y., Sugiura M., Yano M.** (2003): Two ascorbate peroxidases from broccoli: identification, expression and characterization of their recombinant proteins. *Postharvest Biol. Technol.* 27: 147-156.
- Rios-Gonzales K., Erdei L., Lips S.H.** (2002): The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Sci.* 162: 923-930.
- Smirnoff N.** (1996): The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 78: 661-669.
- Starck Z., Choluj D., Niemyska B.** (1995): Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska. Wyd. SGGW: 95-103.
- Toledo M.E.A., Ueda Y., Imahori Y., Ayaki M.** (2003): L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biol. Technol.* 28: 47-57.

NITROGEN DEPENDENT CHANGES IN LOW MOLECULAR WEIGH THIOLS, ASCORBATE, ANTIOXIDATIVE ENZYMES ACTIVITY IN BROCOLI AND CAULIFLOWER

S u m m a r y

Effect of nitrogen fertilization on cysteine, γ -glutamylcysteine, glutathione, ascorbate and some enzyme activity was investigated. Four levels of nitrogen: 40 (control group), 100, 200 and 300 mg N · dm⁻³ and two types of soil: podsol sandy soil and silty loam alluvial soil were tested. Edible part of broccoli 'Fiesta F₁' and cauliflower: 'Lateman' were analyzed. Vegetables were at the stage of commercial maturity. Fertilization had a significant effect on glutathione content and on activity of glutathione reductase and ascorbate peroxidase. The cysteine and γ -glutamylcysteine content depended on the type of soil. The decrease of antioxidant component was usually observed at the level of 100 mg N · dm⁻³ in the soil in comparison with control plants. High levels of nitrogen in the soil (200, 300 mg N · dm⁻³) either caused a increase of antioxidant content or had no effect on the level of those phytochemicals. The antioxidant potential in broccoli 'Fiesta F₁' was significantly higher than in cauliflower 'Lateman'. Moreover, plants grown on podsol sandy soil had higher content of low molecular weigh thiols and ascorbate than those grown on silty loam alluvial soil.