

硫化氢诱导采后香蕉耐冷性的研究

罗自生, 杜瑞雪, 王延圣

(浙江大学食品科学与营养系, 浙江杭州 310058)

摘要: 研究了硫化氢(Sodium hydrosulfide, NaHS)处理对香蕉果实冷害的影响。在 20 °C下, 在密闭容器中, 采后香蕉果实经 0.5 mmol/L NaHS 处理 24 h 后, 置于 7 °C贮藏 14 d。研究发现, 与对照相比, NaHS 处理延缓了香蕉果皮细胞膜透性和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量的增加, 提高了过氧化氢酶(Catalase, CAT)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)和谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)等抗氧化酶活性, 降低了 O₂⁻的生成速率和 H₂O₂的含量, 促进了香蕉果皮酚类物质的积累并增加了还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量, 提高了总抗氧化能力。至贮藏 14 d, 经 NaHS 处理的香蕉的冷害指数比对照低 5.00%, 相对电导率和 MDA 含量分别比对照低 5.36%和 10.26%, CAT、POD、APX 和 GR 活性分别比对照高 36.77%, 35.59%, 6.81%和 21.93%, O₂⁻的生成速率和 H₂O₂的含量分别比对照低 11.39%和 18.78%, 总酚和 GSH 含量分别比对照高 12.12%和 1.27%。研究表明硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)可作为信号分子诱导采后香蕉果实的耐冷能力。

关键词: 香蕉; 硫化氢; 抗氧化酶; 冷害; 硫化氢

文章编号: 1673-9078(2015)2-205-210

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.034

Sodium Hydrosulfide-induced Chilling Resistance in Postharvest Bananas

LUO Zi-sheng, DU Rui-xue, WANG Yan-sheng

(Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The effects of exogenous sodium hydrosulfide (NaHS) treatment on chilling injures in postharvest bananas were investigated. Harvested banana fruits were treated with 0.5 mM/L NaHS at 20 °C for 24 h in a sealed container, and subsequently stored at 7 °C for 14 days. NaHS treatment delayed the increase in membrane permeability and malondialdehyde (MDA) content, increased antioxidant enzyme (catalase [CAT], peroxidase [POD], ascorbate peroxidase [APX], and glutathione reductase [GR]) activity, and reduced the rate of generation of superoxide anion (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) content in treated banana peels, as opposed to the untreated, control fruits. NaHS treatment also enhanced the accumulation of total phenolics, led to an increase in reduced glutathione (GSH) content, and enhanced total antioxidant capacity. After the 14-day cold storage period, the chilling injury index, relative conductivity, MDA content, O₂⁻ generation rate, and H₂O₂ content in banana fruits treated with NaHS were 5.00%, 5.36%, 10.26%, 11.39%, and 18.78% lower, respectively, than those in the control fruits; CAT, POD, APX, and GR activities were 36.77%, 35.59%, 6.81%, and 21.93% higher, respectively, than those in the control fruits. Moreover, the total phenolics and GSH content in the fruit treated with NaHS were 11.39% and 18.78% higher, respectively, than those in the control fruits. These results suggest that hydrogen sulfide could be used as a signaling molecule to induce chilling resistance in postharvest banana fruits.

Key words: banana fruit; sodium hydrosulfide; antioxidant; chilling injury; hydrogen sulfide

冷害是冷敏果蔬贮藏、运输和包装过程中造成损失最严重的问题之一。果蔬贮藏时, 若贮藏温度过高, 虽然果蔬不发生冷害, 但其生理代谢活跃并且易受病菌侵染, 达不到贮藏保鲜的目的; 若贮藏温度过低, 则极易发生冷害^[1]。香蕉和其它热带亚热带果蔬一样, 对低温非常敏感, 其最适贮藏温度为 11~13 °C, 低于 11 °C 就极易发生冷害, 因此研究香蕉冷害的调控技术, 延长其低温贮藏期及货架期寿命具有重要意义。

收稿日期: 2014-05-12

作者简介: 罗自生 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向为农产品采后生理及保鲜

Nguyen 等^[2]通过气调的方式将贮藏环境的氧气浓度控制在 12%, 二氧化碳的浓度控制在 4%, 发现能使贮于 10 °C 下的香蕉冷害症状减轻; Promyou 等^[3]发现香蕉果实经 42 °C 的热水处理后, 延缓了冷藏香蕉果皮的变黑; Pongprasert 等^[4]用 0.03 kJ/m² UV-C 辐照处理采后香蕉果实, 随后置于 8 °C 贮藏, 香蕉的冷害症状和发病率明显减轻; Wang 等^[5]发现, 0.05 mM 硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)能延缓 7 °C 冷藏下香蕉的冷害。虽然这些研究为调控香蕉冷害提供了有益的参考依据, 然而在实际使用的过程中仍然存在需要进一步解决的问题, 开发新型的香蕉冷害调控技术依然

任重道远。

硫化氢(Hydrogen sulfide, H₂S), 起初认为是工业生产中产生的有毒气体, 上世纪八十年代发现植物体可以释放 H₂S, 人们开始注重其生理功能的研究^[6]。目前对植物体内 H₂S 生理功能的研究表明, 其参与了许多植物生长发育的过程, 如调节乙烯诱导的拟南芥气孔的关闭^[7], 促进小麦种子的发育^[8], 缓解干旱^[9]、渗透^[10]和金属离子^[11]等多种非生物胁迫造成的伤害。目前研究发现, 草莓果实经 H₂S 处理后, 呼吸作用明显被抑制, 并且增加了贮藏过程中过氧化氢酶(Catalase, CAT)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)和抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)等抗氧化酶的活性, 降低了 O₂ 的积累, 保鲜效果显著^[12]。此外, H₂S 还能延长花期^[13]及鲜切梨^[14]的货架期, 参与调控植物衰老。虽然 H₂S 在植物中的生物功能逐渐受到关注, 但目前关于 H₂S 在果蔬诱导冷害方面的研究还鲜有报道, 本文以外源硫化氢钠(Sodium hydrosulfide, NaHS)作为 H₂S 供体处理采后香蕉果实, 探讨 H₂S 在诱导采后香蕉果实耐冷性中的作用, 为香蕉冷害调控技术提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

供试香蕉品种为巴西(*Musa spp.*, AAA group cv. 'Brazil'), 成熟度为七~八成, 运回实验室后去轴落梳, 分成单个蕉指, 挑选大小均匀, 果形端正, 无褐斑和机械损伤的香蕉作为试验材料。将 120 根香蕉随机分成两组, 每组 60 根(包含三个重复), 分别用蒸馏水(CK)和 0.5 mmol/L NaHS (Sigma, 化学纯)处理(在 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0、1.2 mmol/L NaHS 预备试验基础上筛选所得)。在 20 °C 下, 在 12 L 密闭容器中用 2 L 0.5 mmol/L NaHS 水溶液释放的 H₂S 熏蒸处理香蕉 24 h。在相同条件下, 以蒸馏水处理为对照组。然后将两组香蕉分别放入塑料筐中, 于 7 °C 恒温箱贮藏 14 d。定期取样测定相关生理指标。

1.2 测定方法

1.2.1 冷害指数测定

冷害指数测定参照 Wang 等^[5]的方法, 稍作改动, 随机抽取 8~10 个香蕉果实, 记录冷害个数 M, 计算每个果实冷害症状的面积与香蕉总面积的比值 P。根据果实表面的冷害面积与果实总面积的百分比, 将香蕉冷害分为 5 个等级, 0 级: P=0; 1 级: P≤20%; 2 级: 20%<P≤40%; 3 级: 40%<P≤60%; 4 级:

60%<P≤80%; 5 级: P>80%。

$$\text{冷害指数} = \frac{\sum(\text{冷害果数} \times \text{冷害级别})}{(\text{总果数} \times 5)}$$

1.2.2 果皮颜色测定

果皮颜色测定参照 Wang 等^[5]的方法, 采用 CR-400 型色差计测定果皮颜色, 结果以 h 值表示, 计算公式 $h = [ATAN](b/a)/2\pi \times 360 + 180$ 。

1.2.3 果皮细胞膜透性和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量的测定

细胞膜透性测定参照 Wang 等^[5]的方法, 用不锈钢的打孔器从香蕉果皮赤道中部切取直径 10 mm 的小圆片, 空白和处理组各取 20 片放入 50 mL 烧杯中, 用蒸馏水冲洗三次, 然后加入 20 mL 蒸馏水, 25 °C 水浴振荡 30 min。测定浸提液的电导率(L₀), 将含有小圆片的浸提液煮沸 30 min, 冷却后测定浸提液的电导率(L₁), 果皮细胞膜透性用相对电导率(L₀/L₁)×100% 表示。

MDA 含量测定参照 Hu 等^[12]的方法。

1.2.4 酶活性的测定

POD 测定参照 Hu 等^[14]的方法。

CAT、APX 和谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)活性测定参照 Hu 等^[12]的方法。

1.2.5 还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量的测定

GSH 的测定参照 Wang 等^[5]的方法。

1.2.6 O₂和 H₂O₂的测定

O₂ 的生成速率和 H₂O₂ 含量测定参照 Hu 等^[12]的方法。

1.2.7 总酚含量和总抗氧化能力的测定

总酚含量的测定参照 Wang 等^[5]的方法, 结果用每克鲜样中没食子酸等价物的量来表示。总抗氧化能力测定采用铁离子还原/抗氧化能力测定法(Ferric reducing antioxidant potential, FRAP)^[5]。

1.3 数据统计分析

所有试验数据应用 DPS 计算机程序进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外源 H₂S 处理对香蕉冷害的影响

从图 1 可以看出, 在 7 °C 贮藏的整个过程中, 香蕉果皮的冷害指数一直增加。经 H₂S 处理后香蕉果皮的冷害指数低于对照组, 其中 0.5 mmol/L NaHS 处理诱导香蕉产生耐冷性的效果最显著, 第 7 d 时, 其冷害指数为对照组的 72.14%, 两者间的差异达到显著水

平($P<0.05$)。随着冷藏时间的增加,冷害症状进一步加重,第14 d时,其中0.5 mmol/L NaHS 处理组冷害指数为对照组的82.25%,两者间的差异达到显著水平($P<0.05$),说明适宜浓度的 H_2S 处理能有效提高采后香蕉果实的耐冷性。试验中不同的NaHS处理浓度(0.1、0.3、0.5、0.8、1.0、1.2 mmol/L)对香蕉果实的耐冷性都有一定的诱导作用,但其中0.5 mmol/L NaHS处理效果最好,故在此试验基础上,优化筛选此处理浓度。

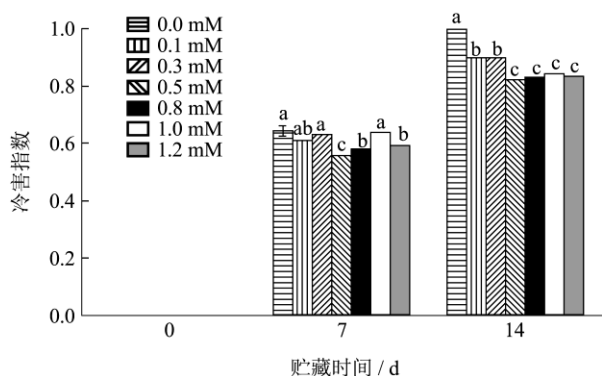


图1 不同浓度的 H_2S 处理对香蕉果实冷害指数的影响

Fig.1 Change in the chilling injury index in bananas treated with the H_2S donor, NaHS, at different concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, and 1.2 mM/L)

2.2 外源 H_2S 处理对香蕉果皮h值、细胞膜透性和MDA含量的影响

果皮颜色一般可以反映冷害症状的变化,遭遇冷害后的香蕉果皮颜色暗绿,严重时变灰绿甚至变黑。图2a的结果表明,反映香蕉果皮颜色变化的参数h值,随着贮藏时间的延长,呈下降趋势, H_2S 处理延缓了h值的下降,对照组和处理组的h值在贮藏期间,差异达到显著水平($P<0.05$)。冷害是低温对植物体造成的生理损伤,细胞质膜是低温对植物损伤的最初部位^[15]。果皮细胞膜透性和MDA含量能够反映细胞膜的损伤程度,从图2b可以看出,香蕉果皮的相对电导率随着贮藏时间的延长呈上升趋势, H_2S 处理延缓了香蕉果皮电导率的上升,第7 d时,对照组电导率是处理组的1.02倍,两者间的差异达到显著水平($P<0.05$),第14 d时,处理组电导率明显低于对照组($P<0.05$)。由图2c可知,在低温贮藏的过程中,MDA含量逐渐增加,对照尤为明显,第7 d时,处理组MDA含量为对照组的88.24%,两者间的差异达到显著水平($P<0.05$),第14 d时,处理组MDA含量为对照组的89.74%,两者间的差异达到显著水平($P<0.05$),表明 H_2S 处理延缓了MDA积累,减轻了细胞膜受到的伤

害。

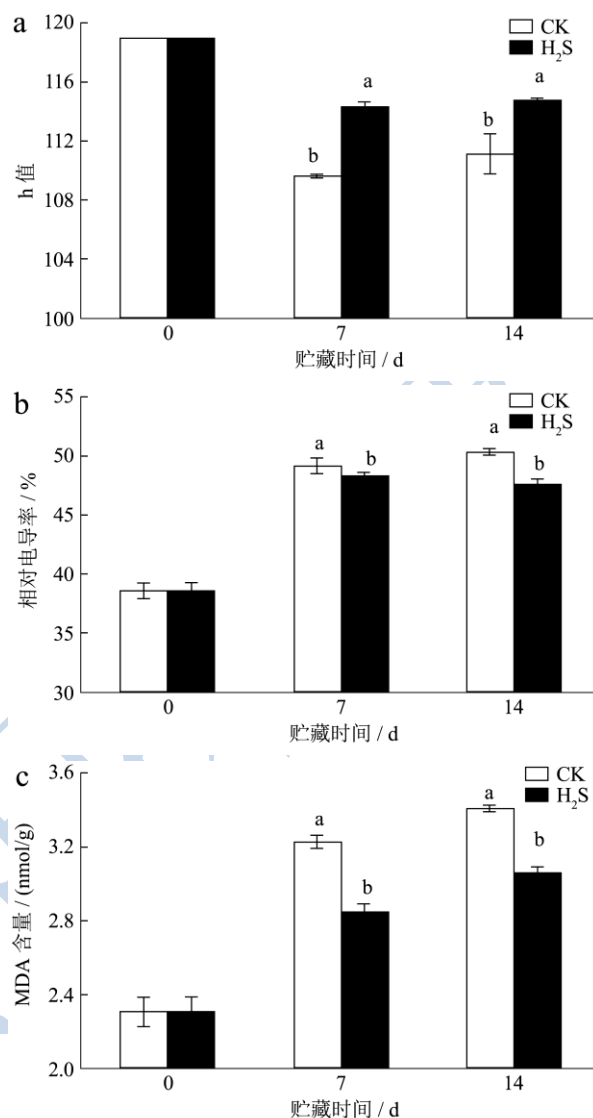


图2 外源 H_2S 处理对香蕉果皮h值,细胞膜透性和MDA含量的影响

Fig.2 Effect of exogenous H_2S treatment on the change in h value, membrane permeability, and MDA content in banana peels

2.3 外源 H_2S 处理对香蕉果皮 O_2 产生速率和 H_2O_2 含量的影响

膜脂过氧化及自由基伤害学说认为,在低温等逆境条件下,植物代谢产生大量的活性氧自由基(O_2^- 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 、 1O_2)等,引起采后果蔬自由基产生与清除系统平衡破坏,导致细胞活性氧累积^[1]。作为电子传递生化过程中的一种代谢产物,正常情况下,活性氧的产生和清除处于平衡状态^[16]。由图3a可知,在贮藏期间, O_2 产生速率随贮藏时间的延长逐渐增加,对照尤为明显, H_2S 处理减缓了 O_2 产生速率。第7 d

时, 对照组 O_2^- 产生速率为处理组的 1.06 倍, 两者间的差异达到显著水平($P < 0.05$), 第 14 d 时, 处理组 O_2^- 产生速率比对照组降低了 11.39%, 两者间差异达到显著水平($P < 0.05$)。由图 3b 可知, 第 0 d 到第 7 d, H_2O_2 含量增加, H_2S 处理延缓了香蕉果皮 H_2O_2 含量的增加, 两者间差异达到显著水平($P < 0.05$), 第 7 d 到第 14 d 时, H_2O_2 含量下降, 处理组 H_2O_2 含量明显低于对照组($P < 0.05$)。说明 H_2S 处理有效抑制了香蕉果皮 O_2^- 和 H_2O_2 的产生, 避免了活性氧的过度积累。

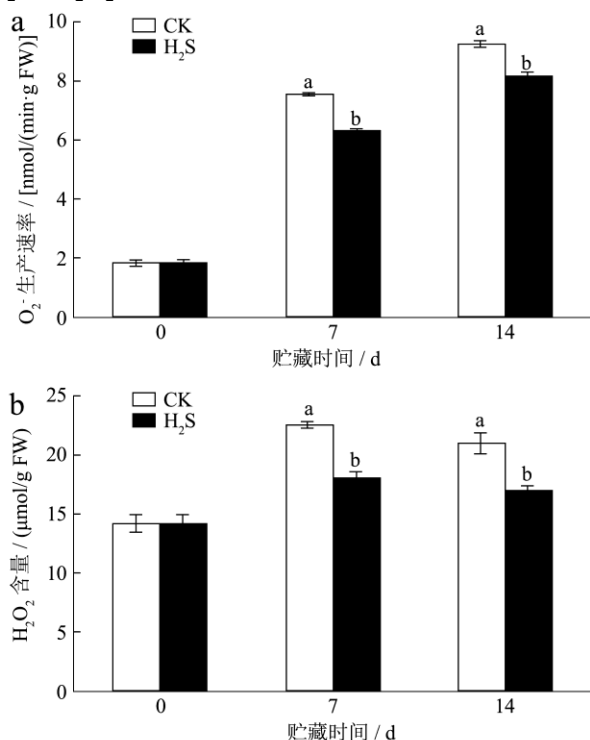


图 3 外源 H_2S 处理对香蕉果皮 O_2^- 和 H_2O_2 含量的影响

Fig.3 Effect of exogenous H_2S treatment on change in O_2^- generation rate and H_2O_2 content in banana peels

2.4 外源 H_2S 处理对香蕉果皮 CAT、POD、APX 和 GR 活性的影响

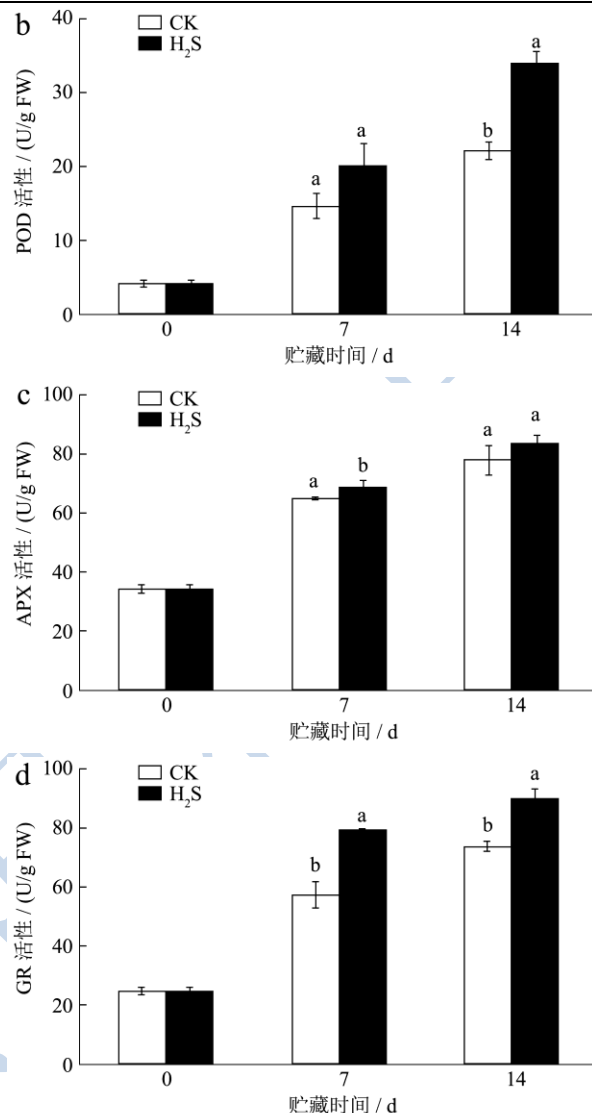
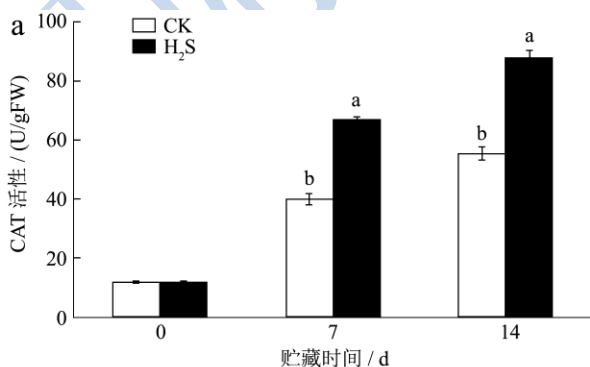


图 4 外源 H_2S 处理对香蕉果皮 CAT, POD, APX 和 GR 活性的影响

Fig.4 Effect of exogenous H_2S treatment on the CAT, POD, APX, and GR activities in banana peels during cold storage (at $7\text{ }^\circ\text{C}$)

植物在长期进化过程中形成了多种机制以清除活性氧, CAT、POD、APX 和 GR 是植物体内清除活性氧的关键酶, 可清除植物体内积累的活性氧自由基, 从而减轻冷害^[17]。7 $^\circ\text{C}$ 贮藏期间, 香蕉果皮 CAT、POD、APX 和 GR 活性的变化如图 4 所示, H_2S 处理提高了 CAT、POD、APX 和 GR 活性。第 7 d 时, 对照组 CAT 活性为处理组的 59.90%, 二者间的差异达到显著水平($P < 0.05$), 第 14 d 时, 对照组 CAT 活性为处理组的 63.23%, 二者间的差异达到显著水平($P < 0.05$) (图 4a), CAT 活性的提高减少了植物体内 H_2O_2 的积累, 从而减少了 H_2O_2 对果蔬组织可能造成的氧化伤害。图 4b 显示, 第 7 d 时, 处理组 POD 活性比对照增加了

37.15%，随着贮藏时间的延长，两者间的差异继续增加，第 14 d 时，对照组 POD 活性为处理组的 64.41%，二者间差异达到显著水平(P<0.05)。图 4c 显示，贮藏到第 7 d 时，处理组 APX 活性有明显提高(P<0.05)，随后，APX 活性升高的速率趋于平缓，第 14 d 时，处理组 APX 活性仍然高于对照组，但两者差别不大(P>0.05)。从图 4d 可以看出，第 7 d 时，对照组 GR 活性为处理组的 72.34%，二者间差异达到显著水平(P<0.05)，第 14 d 时，处理组 GR 活性比对照增加了 21.93%，二者间差异达到显著水平(P<0.05)。Fu^[18]用 H₂S 供体 NaHS 处理受到低温胁迫的葡萄植株时，发现增加了葡萄叶片抗氧化酶的活性，而用 H₂S 清除剂 HT(hypotaurine)处理则得到相反的结果。

2.5 外源 H₂S 处理对香蕉果皮 GSH 含量、总酚含量和总抗氧化能力的影响

在植物体内，除了抗氧化酶以外，还存在一些非酶类的抗氧化物质，例如 GSH、抗坏血酸(Ascorbic acid, ASA)、总酚等^[5]。由图 5a 可以看出，在贮藏期间，处理组 GSH 含量始终高于对照组，第 7 d 时，GSH 含量明显增加，处理组尤为明显(P<0.05)。处理组 GSH 含量比对照组增加了 10.78%，两者间的差异达到显著水平(P<0.05)。第 14 d 时，对照组 GSH 含量和处理组差别不大(P>0.05)。由图 5b 看出，在整个贮藏的过程中，对照组总酚含量均低于处理组。从第 0 d 到第 7 d，对照组总酚含量有所下降，处理组总酚含量则有所上升，对照组总酚含量为处理组的 87.88%，两者间差异达到显著水平(P<0.05)。第 14 d 时，对照组和处理组总酚含量相较于第 7 d 都有所下降，对照尤为明显，对照组总酚含量为处理组的 85.62%，两者间差异达到显著水平(P<0.05)。FRAP 变化如图 5c 所示，对照组 FRAP 始终低于处理组，第 7 d 时，处理组 FRAP 比对照增加了 8.21%，两者间差异达到显著水平(P<0.05)。第 14 d 时，两者间的差异进一步增大，对照组 FRAP 为处理的 86.80%，两者间差异达到显著水平(P<0.05)。GSH 含量的提高可能是由于 H₂S 处理增加了 GR 活性，从而有更多 GSH 产生，而积累的 GSH 和总酚等物质导致了总抗氧化能力的提升。这说明 H₂S 也可能通过增加一些非酶类抗氧化物质的合成，提高香蕉的抗冷性。

3 结论

本试验结果表明，0.5 mmol/L NaHS 处理能有效缓解采后香蕉果皮细胞膜透性和 MDA 含量的增加，

抑制果皮外观颜色变暗变黑，提高 CAT、POD、APX 和 GR 等抗氧化酶活性分别高达 36.77%，35.59%，6.81%和 21.93%，降低了 11.39%的 O₂生成速率和 18.78%的 H₂O₂含量，同时，NaHS 处理使香蕉果皮总酚和 GSH 含量增加，提高了总抗氧化能力，香蕉冷害症状明显减轻。因此认为，0.5 mmol/L NaHS 处理可诱导采后香蕉果实的耐冷能力。其作用机理可能是通过增加抗氧化酶的活性及非酶类抗氧化物质的含量，避免活性氧自由基的过度积累，从而减轻香蕉在低温下受到的伤害。

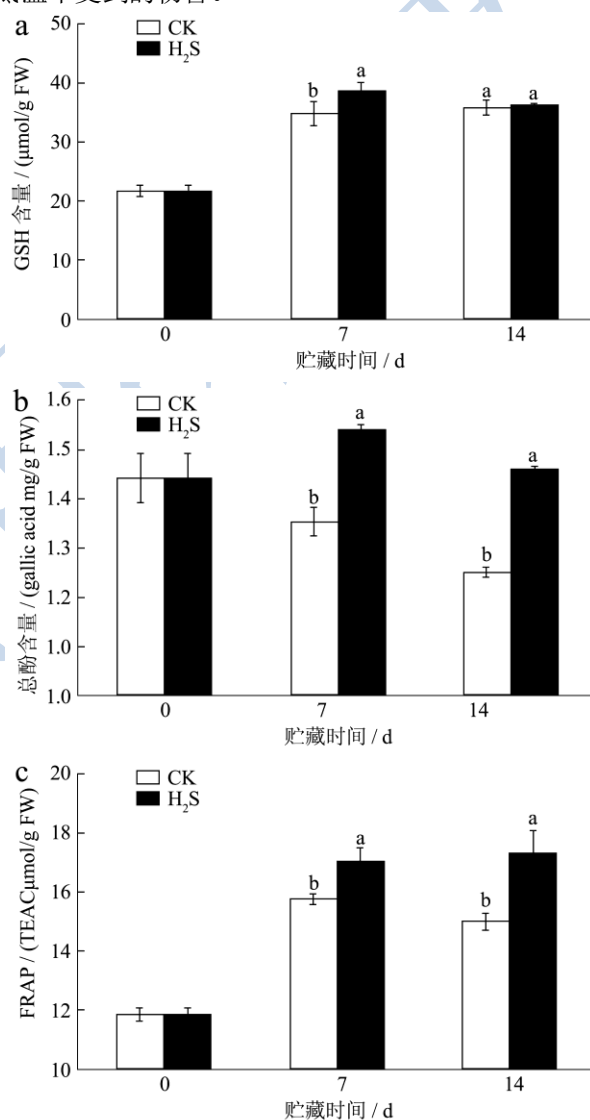


图 5 外源 H₂S 处理对香蕉果皮 GSH，总酚含量和 FRAP 的影响
Fig.5 Effect of exogenous H₂S treatment on the GSH and total phenolics content, and ferric reducing antioxidant power in banana peels during cold storage (at 7 °C)

参考文献

[1] 陆旺金,张昭其,季作梁,等.热带亚热带果蔬低温贮藏冷害及御冷技术[J].植物生理学通讯,1999,35(2):158-163

- LU Wang-jin, ZHANG Zhao-qi, JI Zuo-liang, et al. Chilling injury and approaches to reduce chilling injury of tropical and subtropical fruits and vegetables during low temperature storage [J]. *Plant Physiology Journal*, 1999, 35(2): 158-163
- [2] Nguyen T B T, Ketsa S, van Doorn W G. Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel browning in banana [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 31: 313-317
- [3] Promyou S, Ketsa S, van Doorn W G. Hot water treatments delay cold-induced banana peel blackening [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 48: 132-138
- [4] Pongprasert N, Sekozawa Y, Sugaya S, et al. A novel postharvest UV-C treatment to reduce chilling injury (membrane damage, browning and chlorophyll degradation) in banana peel [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130: 73-77
- [5] Wang Y S, Luo Z S, Du R X, et al. Effect of nitric oxide on antioxidative response and proline metabolism in banana during cold storage [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61: 8880-8887
- [6] 崔为体,沈文飏.植物中硫化氢的生理功能及其分子机理[J]. *生命的化学*, 2012, 32(4): 385-389
- CUI Wei-ti, SHEN Wen-biao. Physiological function and its molecular mechanism of hydrogen sulfide in plants [J]. *Chemistry of Life*, 2012, 32(4): 385-389
- [7] Hou Z H, Wang L X, Liu J, et al. Hydrogen sulfide regulates ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(3): 277-289
- [8] Zhang H, Hu L Y, Hu K D, et al. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates the oxidative damage against copper stress [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(12): 1518-1529
- [9] Jin Z P, Xue S W, Luo Y N, et al. Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 62: 41-46
- [10] Anastasis C, George A M, Ioannis P, et al. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 7: 1953-1966
- [11] Zhang H, Hu L Y, Li P, et al. Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat [J]. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(4): 743-747
- [12] Hu L Y, Hu S L, Wu J, et al. Hydrogen sulfide prolongs postharvest shelf life of strawberry and plays an antioxidative role in fruits [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 8684-8693
- [13] Zhang H, Hu S L, Zhang Z J, et al. Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 60(3): 251-257
- [14] Hu K D, Wang Q, Hu L Y, et al. Hydrogen sulfide prolongs postharvest storage of fresh-cut pears (*Pyrus pyrifolia*) by alleviation of oxidative damage and inhibition of fungal growth [J]. *Plos One*, 2014, 9(1): 1-9
- [15] 王毅,杨宏福,李树德.园艺植物冷害和抗冷性的研究[J]. *园艺学报*, 1994, 21(3): 239-244
- WANG Yi, YANG Hong-fu, LI Shu-de. Studies on chilling injury and chilling resistance of horticultural plants [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1994, 21(3): 239-244
- [16] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutases [J]. *Plant Physiology*, 1993, 101: 7-12
- [17] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review [J]. *Annals Botany*, 2003, 91: 179-194
- [18] Fu P N, Wang W J, Hou L X, et al. Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in *Vitis inifera L.* [J]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2013, 82(4): 295-302