

SZYMON JASTRZĘBOWSKI, WŁADYSŁAW KANTOROWICZ, EWA ANIŚKO,  
JOANNA UKALSKA

## Konduktometryczna metoda oceny żywotności nasion sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i daglezi zielonej (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)\*

Conductivity test for Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) seeds vitality assessment

### ABSTRACT

Jastrzębowski S., Kantorowicz W., Aniśko E., Ukalska J. 2017. Konduktometryczna metoda oceny żywotności nasion sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i daglezi zielonej (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). Sylwan 161 (11): 927-934.

The level of damage to the cell membranes is a sign of aging of the seeds and a decrease in their viability. Conductometric seed testing method indirectly utilizes uncontrolled leakage of ions from seeds with damaged cell membranes to assess their viability. This involves the use of an electrical conductivity of the aqueous solution, in which seeds are soaked. The research was conducted in the years 2011-2014 and aimed at developing the methodology of evaluation of Scots pine and Douglas fir seeds by conductivity test. The aim of the study was to determine the relationship between electrolyte leakage and germination capacity of Scots pine and Douglas fir seeds. 402 samples of Scots pine seed and 90 specimens of Douglas fir seed from all over Poland were tested. The research material was both freshly harvested and stored. Scots pine seeds were obtained in the years 2008-2014, while Douglas fir – 2003-2013 as well as ones stored in the refrigerator for 15 years. Conductivity test and standard seed germination procedure of the analyzed species were used. For both Scots pine and Douglas fir, we noted that, as the electrolyte leakage rate increased, the germination capacity of the seed decreased. So we decided to test whether the vitality of the seeds was determined by means of a conductivity test. The best-fit regression model was determined and the mean expected germination capacity in the viability classes was calculated. 95% confidence intervals for the regression function were also determined. Evaluation of the viability of the seeds by means of the conductometric method is especially useful for seeds requiring a long stratification period (e.g. Douglas fir to determine the potential loss of their vitality. Although the ISTA seed evaluation rules do not require conductivity test for evaluating the seeds of Scots pine and Douglas fir, it may be applicable in situations where it is necessary to perform a rapid assessment of viability before spring sowing.

### KEY WORDS

vitality class, electrolyte leakage, conductometry, seed

### ADDRESSES

Szymon Jastrzębowski <sup>(1)</sup> – e-mail: s.jastrzebowski@ibles.waw.pl  
Władysław Kantorowicz <sup>(1)</sup>, Ewa Aniśko <sup>(1)</sup>, Joanna Ukalska <sup>(2)</sup>

\*Artykuł powstał podczas realizacji tematu badawczego BLP-360 „Ocena nasion drzew i krzewów leśnych – monitoring obradzenia drzew i jakości materiału siewnego” zleconego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych.

<sup>(1)</sup> Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

<sup>(2)</sup> Zakład Biometrii, Katedra Ekonometrii i Statystyki, SGGW w Warszawie; ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

## Wstęp

Starzenie się nasion jest procesem fizjologicznym, podczas którego następuje stopniowa degradacja błon komórkowych (zarówno strukturalna, jak i funkcjonalna), białek, układu enzymatycznego, a także DNA komórkowego. Istotną rolę w tym procesie odgrywają reaktywne formy tlenu, tzw. ROS (ang. reactive oxygen species), biorące udział w regulacji metabolizmu nasion na różnych etapach rozwoju [Krasuska i in. 2011]. Należą do nich m.in. anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ) i nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), które powstają na skutek niecałkowitej redukcji cząsteczki tlenu. Oprócz roli przekaźnika informacji niezbędnych do prawidłowego przebiegu funkcji życiowych nasion, takich jak procesy dojrzewania, przerywania spoczynku czy kiełkowania, ich nadmiar może powodować poważne uszkodzenia tkanek [Bailly i in. 2008]. W procesie starzenia degradacji ulegają fosfolipidy i białka. Kwasy polifosfolipidowe, które obok białek są jednym z głównych składników błon komórkowych, najszybciej ulegają procesowi utlenienia. W wyniku peroksydacji lipidów powstają m.in. aldehydy (dialdehyd malonowy), hydroksyaldehydy oraz węglowodory. Produkty te powodują modyfikację właściwości fizycznych błon komórkowych. Obniżają hydrofobowość lipidowego wnętrza błon, depolaryzują błony i zaburzają ich asymetrię lipidową, hamują aktywność enzymów oraz białek transportujących. Czynniki te powodują utratę integralności błon komórkowych. W konsekwencji powstają szczeliny, które zmieniają ich przepuszczalność. W wyniku uszkodzenia błon dochodzi do dalszych reakcji lawinowych wiodących do śmierci komórek, a w końcowym etapie całego starzejącego się organu. Poziom uszkodzenia błon komórkowych jest zatem oznaką starzenia się nasion, a zarazem spadku ich żywotności. W procesie pęcznienia nasion (imbibicji) uszkodzenie prowadzi do niekontrolowanego wycieku jonów [Powell 1986].

Konduktometryczna metoda oceny nasion pośrednio wykorzystuje niekontrolowany wyciek jonów z nasion mających uszkodzone błony komórkowe do oceny ich żywotności. Polega ona na wykorzystaniu elektrycznej przewodności roztworu wodnego, w którym moczone są nasiona, do wyznaczenia żywotności nasion. Oprócz uszkodzenia błon komórkowych na stopień wpływu elektrolitu z nasion podczas imbibicji wpływa również faza dojrzałości oraz ich wiek [Powell 1986]. Test jest wykorzystywany w ocenie jakości dużych nasion jadalnych [Hampton 1995], a także nasion drzew leśnych [Ramos i in. 2012]. Ram i Wiesner [1988] wykazali, że sztuczne postarzanie zwiększa przepuszczalność błon komórkowych, zwiększając jednocześnie wpływ elektrolitu z nasion pszenicy. W niektórych przypadkach, np. w nasionach soi, które mają dużą zawartość wody (powyżej 25%), wyciek elektrolitu nie następuje i w związku z tym nie da się określić jakości nasion [Vertucci, Leopold 1984]. Nawet w przypadku gatunków, dla których test konduktometryczny jest przydatny, zdarzają się przypadki znacznych odstępstw od wyznaczonego modelu zależności i dlatego przyszłe badania powinny się skoncentrować na analizie związków, które wpływają z nasion [McDonald 1998].

Test konduktometryczny może mieć zastosowanie w przypadku nasion wymagających długiego okresu przysposabiania do siewu, dla których testy barwienia tetrazoliną obarczone są dużym błędem (np. nasiona buka) [Procházková 2000; Gugala 2001]. Metodę oceny nasion buka testem konduktometrycznym opracował Załęski i in. [2004]. Badania potwierdziły, że jest ona bardziej precyzyjna niż metoda barwienia tetrazoliną.

Pilotażowe badania nad przydatnością metody konduktometrycznej do oceny żywotności nasion sosny i świerka przeprowadzili Załęski i in. [2001]. Wykazały one, że istnieje ujemna korelacja pomiędzy żywotnością nasion oznaczoną metodą kiełkowania a współczynnikiem wpływu elektrolitu. Badania były oparte na małej liczbie prób i w związku z tym ich wyniki nie pozwoliły na precyzyjne określenie żywotności nasion. Stwierdzono jedynie, że metoda konduktometryczna może być stosowana w przypadku potrzeby szybkiej oceny utraty żywotności, np. u nasion przechowywanych długoterminowo lub niewłaściwie pozyskanych.

Celem pracy było opracowanie metodyki oceny nasion sosny zwyczajnej i daglezi zielonej testem konduktometrycznym. Spodziewano się, że przy dużej liczbie przeprowadzonych prób uda się dość precyzyjnie określić żywotność (zdolność kiełkowania) nasion. Przy ocenie żywotności daglezi zielonej test konduktometryczny byłby znacznie szybszy niż tradycyjna metoda kiełkowania, która dla tego gatunku zajmuje około 6 tygodni. W przypadku sosny zwyczajnej mógłby znaleźć zastosowanie w razie potrzeby oceny nasion na krótko przed wysiewem.

## Materiał i metody

Do badania nad określeniem żywotności nasion metodą konduktometryczną użyto nasion pochodzących zarówno z próbek przysyłanych przez wyuszczarnie i nadleśnictwa, jak też nasion przechowywanych w chłodni Zakładu Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa. Ogółem w latach 2011-2014 przebadano 402 próbki sosny zwyczajnej, w tym w 2011 roku 101 próbek z 53 nadleśnictw, w 2012 roku 114 próbek z 47 nadleśnictw, w 2013 roku 122 próbki z 65 nadleśnictw, a w 2014 roku 65 próbek z 40 nadleśnictw. Równolegle badano próbki daglezi zielonej (łącznie 90 próbek), w tym odpowiednio 8 próbek z 7 nadleśnictw, 10 próbek z 10 nadleśnictw, 25 próbek z 15 nadleśnictw i 47 próbek z 34 nadleśnictw. Materiał badawczy stanowiły zarówno nasiona świeżo zebrane, jak też przechowywane. Sosnę zwyczajną reprezentowały nasiona pozyskane w latach 2008-2014, natomiast daglezie zieloną nasiona z lat 2003-2013 oraz przechowywane w chłodni od 1998 roku.

Aby zbadać możliwość zastosowania metody konduktometrycznej do oznaczania żywotności nasion, niezależnie od ich okresu przechowywania, porównywano jej wyniki ze standardowym testem kiełkowania, który w przypadku sosny zwyczajnej i daglezi zielonej jest obowiązujący w stosowanych obecnie zasadach oceny nasion. W metodzie kiełkowania pobierano z każdej próbki po 100 nasion w czterech powtórzeniach, tj. łącznie 400 nasion (w wyjątkowych wypadkach, gdy próbki były zbyt małe, 300 nasion). Przed pobraniem nasion wykonywana była analiza czystości według metodyki zawartej w pracy Załęskiego i Kantorowicza [2000]. W jej wyniku oddzielone zostały nasiona obcych gatunków oraz pozostałe rodzaje zanieczyszczeń. Następnie z tak wydzielonej frakcji nasion czystych odliczano nasiona przeznaczone do siewu. Test kiełkowania prowadzono według metodyki podanej w pracy Załęskiego i in. [2000].

Pobierając próbki do badań konduktometrycznych, postępowano podobnie jak w przypadku testu kiełkowania, tzn. najpierw wykonywano analizę czystości nasion, a następnie z frakcji nasion czystych odważano 4 razy po 1 g nasion (w przypadku małych próbek 3×1 g).

Na tak przygotowanych próbkach nasion prowadzono badania konduktometryczne według zmodyfikowanej metodyki Leinonena [1998]. Procedura polegała na:

- 1) opłukaniu nasion dwukrotnie wodą dejonizowaną w celu usunięcia zanieczyszczeń zewnętrznych, które mogłyby zmienić wartość przewodności elektrolitu,
- 2) umieszczeniu każdej próbki (1 g nasion) w szklanej zlewce o pojemności 250 ml i zalaniu jej 150 ml wody dejonizowanej,
- 3) przykryciu zlewek przepuszczającym powietrze parafilmem i umieszczeniu na 24 godziny w termostacie, w stałej temperaturze  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ,

- 4) pomiarze przewodnictwa roztworu wodnego z nieuszkodzonymi nasionami ( $EC_1$ ) za pomocą konduktometru laboratoryjnego,
- 5) dokonaniu całkowitego zniszczenia struktury komórek nasion poprzez ich rozdrobnienie przy użyciu homogenizatora, stosując od 8000 do 14 000 obrotów na minutę oraz zaznaczeniu poziomu roztworu markerem na zewnątrz zlewki,
- 6) umieszczeniu zlewek przykrytych folią aluminiową w kuchence mikrofalowej aż do zagotowania (około 5 minut) i w przypadku wyparowania części płynu uzupełnieniu roztworu wodą dejonizowaną do zaznaczonego uprzednio markerem poziomu,
- 7) powtórnyemu zmierzeniu przewodności roztworu ( $EC_2$ ) powstałego z całkowicie zniszczonych nasion po jego ostudzeniu do temperatury pokojowej,
- 8) obliczeniu współczynnika wypływu elektrolitu (EL) z nasion według wzoru:

$$EL = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100 \%$$

Do pomiaru przewodności roztworu użyto konduktometru HI 8733 (Hanna Instruments). Przewodność wodnego roztworu całych (nieuszkodzonych) nasion mierzono w zakresie od 0 do 199,9  $\mu\text{S/cm}$ . W przypadku nasion poddanych całkowitej destrukcji, gdy przewodność przekraczała wartość 199,9  $\mu\text{S/cm}$ , konieczna była zmiana skali konduktometru na zakres od 0 do 1999  $\mu\text{S/cm}$  i jego kalibracja.

W celu zbadania zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą konduktometryczną i metodą kiełkowania wykonano analizę regresji pomiędzy zdolnością kiełkowania nasion (GC) a wielkością współczynnika wypływu elektrolitu z nasion (EL). Dla obu gatunków wybrano funkcje regresji najlepsze pod względem współczynnika determinacji. Usunięto obserwacje odstające i sprawdzono założenie o normalności reszt funkcji regresji. W przypadku niespełnienia założenia o normalności reszt stosowano transformację Bliss'a ( $\arcsin x^{0,5}$ ).

W przypadku sosny, w celu wykorzystania wyznaczonej funkcji regresji do oszacowania spodziewanej zdolności kiełkowania, wyliczone wartości GC<sub>tr</sub> transformowano powtórnie na wartości procentowe, stosując funkcję odwrotną do transformacji Bliss'a:  $GC = \sin(\arcsin x^{0,5})^2$ . Wyznaczono też 95-procentowe przedziały ufności dla funkcji regresji dla takich wartości współczynnika wypływu elektrolitu, które wyznaczały granice klas żywotności (tab.). Każda partia nasion poddanych ocenie jest zaliczana do odpowiedniej klasy żywotności. Podstawą do zaliczania nasion do jednej z trzech klas (I, II lub III) lub uznania ich za nienadające się do użytku (<III) są wyniki próby kiełkowania lub oceny żywotności (w zależności od gatunku) oraz ich czystość.

**Tabela.**

Klasy żywotności (I-<III) nasion sosny zwyczajnej (So) i dąglezji zielonej (Dg) wyznaczone na podstawie minimalnej energii (GE [%]) i zdolności (GC [%]) kiełkowania

Vitality classes (I-<III) for Scots pine (So) and Douglas fir (Dg) seeds based on the minimum germination energy (GE [%]) and capacity (GC [%])

	So-GE	So-GC	Dg-GE	Dg-GC
I	85	91	53	71
II	70	81	26	51
III	50	70	15	30
<III	<50	<70	<15	<30

Jeśli GE i GC odpowiadają różnym klasom, nasiona zalicza się do klasy niższej

If GE and GC are appropriate for different classes, seeds are assigned to the lower class

## Wyniki

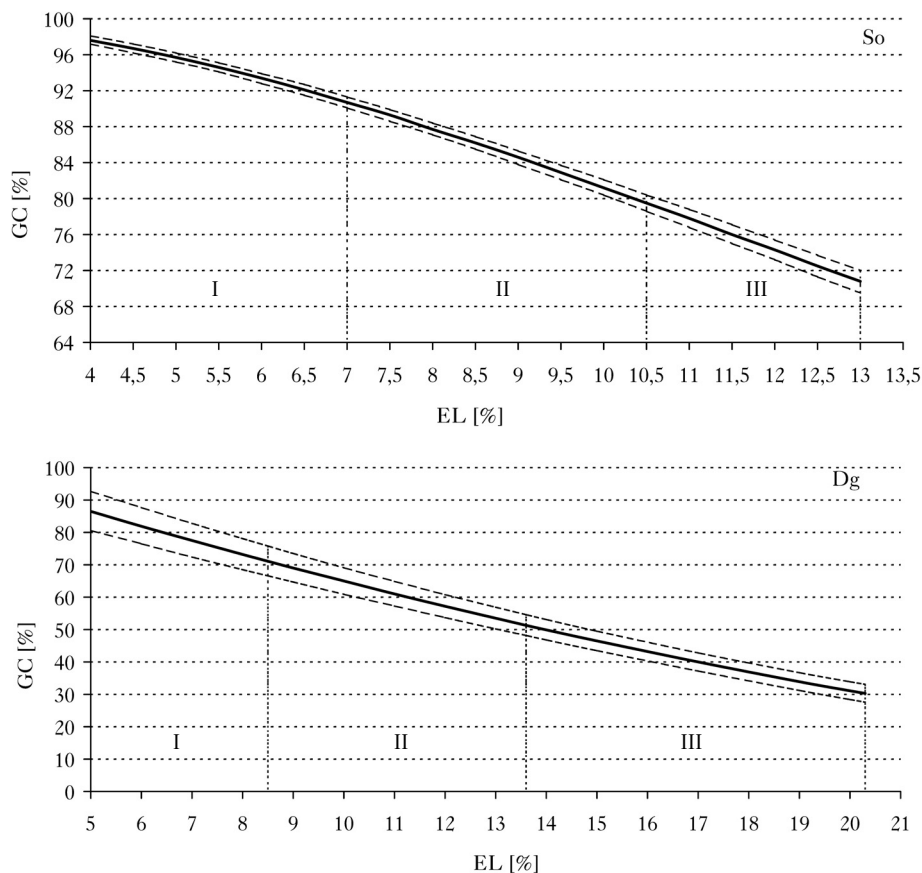
SOSNA ZWYCZAJNA. Analizując badane próbki sosny, zauważono, że gdy współczynnik wpływu elektrolitu był większy od 14,7%, to występowały znaczne wahania zdolności kiełkowania, a ponadto w zdecydowanej większości przypadków jakość nasion była poniżej III klasy żywotności. Z tego względu wzięto pod uwagę tylko te próbki, których współczynnik wpływu elektrolitu był niższy niż 14,7%. Odrzucono także jedną próbkę, której zdolność kiełkowania była słaba, mimo że współczynnik wpływu elektrolitu był niski (1 przypadek na ponad 400 próbek). Dla danych transformowanych funkcją regresji istotnie ( $p < 0,001$ ) opisującą zależność pomiędzy zdolnością kiełkowania a współczynnikiem wpływu elektrolitu była funkcja  $GC = \exp(0,503 - 0,039 \times EL)$ , dla której założenie o normalności reszt było spełnione ( $p = 0,697$ ). Współczynnik determinacji  $R^2$  wyniósł 78%.

Uzyskane współczynniki determinacji oraz 95-procentowe przedziały ufności (ryc.) dają podstawę, aby sądzić, że wartość oczekiwana zdolności kiełkowania obliczona na podstawie współczynnika wpływu elektrolitu będzie dobrze odzwierciedlać rzeczywistą zdolność kiełkowania, jaką uzyskano by po przeprowadzeniu testu kiełkowania. W przypadku nasion sosny zwyczajnej dla współczynnika wpływu elektrolitu równego 7,0%, który wyznacza dolną granicę dla żywotności I klasy, rozpiętość tego przedziału wynosi zaledwie 1,2% (od 90,1 do 91,3%), dla współczynnika 10,0%, wyznaczającego dolną granicę II klasy – 1,7% i dla współczynnika 13,0%, wyznaczającego dolną granicę III klasy – 2,5%. Wartość współczynnika wpływu elektrolitu powyżej 13,0% wskazuje na to, że nasiona nie nadają się do wysiewu.

DAGLEZJA ZIELONA. Powyżej wartości  $EL = 35\%$  nie stwierdzono zdolności kiełkowania większej od zera wśród żadnej z 12 próbek. Do określenia zależności pomiędzy  $GC$  i  $EL$  wzięto pod uwagę tylko te przypadki, dla których wartość współczynnika wpływu elektrolitu była mniejsza od 35%. Najlepsza pod względem współczynnika determinacji ( $R^2 = 85,6\%$ ;  $p < 0,001$ ) funkcja regresji przyjęła postać  $GC = (10,544 - 0,248 \times EL)^2$ . Założenie o normalności reszt wyznaczonej funkcji było spełnione ( $p = 0,956$ ). Współczynnik determinacji między wpływem elektrolitu z nasion a zdolnością kiełkowania był wyższy niż w przypadku nasion sosny zwyczajnej. Jednak 95-procentowe przedziały ufności wyznaczone dla poszczególnych wartości współczynnika wpływu elektrolitu miały znacznie szerszy zakres (ryc.). Dla współczynnika 8,5%, wyznaczającego dolną granicę dla żywotności I klasy, rozpiętość tego przedziału wynosi 9,2%, dla współczynnika 13,6%, wyznaczającego dolną granicę II klasy – 6,4%, a dla współczynnika 20,3%, wyznaczającego dolną granicę III klasy – 5,5%. Wynika z tego, że bardziej precyzyjnie możemy określić granicę pomiędzy nasionami o żywotności III klasy a nasionami o żywotności poniżej III klasy niż na granicy klas II i III, a tym bardziej I i II. Nasiona o  $EL$  powyżej 5,0-8,5% zaliczono do I klasy żywotności (ryc.). Współczynnik  $EL$  pomiędzy 8,5 a 13,6% determinował przynależność nasion do II klasy żywotności, natomiast  $EL$  powyżej 13,6 do 20,3% wskazywał na III klasę żywotności. Powyżej  $EL = 20,3\%$  nasiona zakwalifikowano poniżej III klasy żywotności.

## Dyskusja

W prezentowanych badaniach sporadycznie występowały próbki, w których mimo niskiego współczynnika wpływu elektrolitu nasiona nie kiełkowały, co może być związane ze zmianami biochemicznymi w przechowywanych nasionach [Kaewnaee i in. 2011]. W niniejszych badaniach znajdowano także takie próbki, które pomimo wysokiego współczynnika wpływu elektrolitu kiełkowały dość dobrze. Okazało się, że jedna z takich próbek miała niską energię kiełkowania



### Ryc.

Związek pomiędzy wpływem elektrolitu (EL) a wartością oczekiwaną zdolności kiełkowania (GC) nasion sosny zwyczajnej (So) i dąglezji zielonej (Dg)

Relationship between electrolyte leakage (EL) and expected mean of germination capacity (GC) for Scots pine (So) and Douglas fir (Dg) seeds

linia przerywana – 95-procentowy przedział ufności; I-III – klasa żywotności nasion  
dotted line – 95% confidence interval; I-III – seed vitality class

i mimo dość wysokiej zdolności kiełkowania nasiona zaklasyfikowano poniżej III klasy jakości. Druga z próbek, której zarówno zdolność, jak i energia kiełkowania były wysokie, a współczynnik wpływu elektrolitu wynosił około 30%, po kilku miesiącach przechowywania gwałtownie straciła żywotność i jej zdolność kiełkowania wynosiła zaledwie 15%. Podobne wyniki można także uzyskać, jeżeli w próbce nasion poddanej badaniom konduktometrycznym znajdują się nasiona z uszkodzeniami mechanicznymi, które powodują znaczny wpływ jonów do roztworu. Dlatego bardzo ważne jest, aby nasiona do badań konduktometrycznych nie miały takich uszkodzeń.

Zarówno w przypadku sosny zwyczajnej, jak i dąglezji zielonej testy mogą być stosowane jako pomocnicze przy określaniu żywotności nasion przechowywanych. Z bardzo dużym prawdopodobieństwem możemy oznaczyć nasiona nienadające się do siewu – dla nasion dąglezji zielonej graniczną wartością współczynnika wpływu elektrolitu jest w tym wypadku 20,3%,

a dla sosny – 13,0%. Należy jednak pamiętać, że wartości te odpowiadają oczekiwanym wartościom zdolności kiełkowania. Wśród badanych próbek nasion daglezi zielonej nie wystąpiła ani jedna, dla której obliczony współczynnik wypływu elektrolitu byłby wyższy niż przyjęty w prezentowanych badaniach i próbka ta zostałaby zakwalifikowana do III klasy żywotności. W przypadku nasion sosny zwyczajnej takie próbki występowały nawet przy wartości współczynnika bliskiego 19% (nie licząc próbek, które zostały odrzucone). Z tego względu przed ostatecznym stwierdzeniem, że próbki nie nadają się do siewu, a wartość współczynnika elektrolitu jest u nich nieco tylko niższa od granicznej, należy je poddać testowi kiełkowania. Mimo iż międzynarodowe przepisy oceny nasion ISTA nie przewidują metody konduktometrycznej do oceny nasion sosny zwyczajnej i daglezi zielonej, to może ona mieć zastosowanie w sytuacji, gdy niezbędne jest dokonanie szybkiej oceny żywotności przed siewem wiosennym, zwłaszcza jeśli chodzi o daglezę, wymagającą wstępnego przysposobienia nasion do wysiewu.

## Wnioski

- ✦ Na podstawie dokonanych analiz próbek nasion sosny zwyczajnej i daglezi zielonej można stwierdzić, że zachodzi istotna zależność pomiędzy współczynnikiem wypływu elektrolitu z nasion a ich zdolnością kiełkowania.
- ✦ Ocena nasion sosny i daglezi metodą konduktometryczną, ze względu na krótki czas jej trwania (2 dni), może mieć zastosowanie do oceny nasion tuż przed siewem wiosennym, jeśli za późno jest na ocenę metodą kiełkowania. Dotyczy to szczególnie nasion daglezi.
- ✦ Metoda konduktometryczna łącznie z metodą kiełkowania może być wykorzystana do lepszego monitorowania stanu nasion przechowywanych i wskazywania zapasów nasion, których żywotność może ulec pogorszeniu.
- ✦ Ze względu na przybliżone wyniki oceny metodą konduktometryczną próbki nasion o współczynniku wypływu elektrolitu kwalifikującym je nieco poniżej III klasy powinny zostać sprawdzone testem kiełkowania.

## Literatura

- Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H., Corbineau F. 2008. From intracellular signaling network to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331: 806-814.
- Gugała A. 2001. Zmiany jakości nasion buka przechowywanych w Leśnym Banku Genów Kostrzyca. W: Od badań do wdrożeń w zakresie fizjologii i genetyki nasion drzew leśnych. Materiały międzynarodowej konferencji naukowo-szkoleniowej. Puszczykowo, 26-28.09.2001.
- Hampton J. G. 1995. Conductivity test. ISTA seed vigor testing seminar. Copenhagen, ISTA. 10-28.
- Kaewnaree P., Vichitphan S., Klanrit P., Siri B., Vichitphan K. 2011. Effect of Accelerated Aging Process on Seed Quality and Biochemical Changes in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* Linn.) Seeds. *Biotechnology* 10: 175-182. DOI: 10.3923/biotech.2011.175.182.
- Krasuska U., Gniazdowska A., Bogatek R. 2011. Rola ROS w fizjologii nasion. *Kosmos* 1-2: 113-128.
- Leinonen K. 1998. Effect of storage conditions on dormancy and vigor of *Picea abies* seeds. *New Forests* 16: 231-249.
- McDonald M. B. 1998. Seed quality assessment. *Seed Science Research* 8: 265-275.
- Powell A. A. 1986. Cell membranes and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for soaking. *Journal of Seed Technology* 10: 81-100.
- Procházková Z. 2000. Kontrola kvality semen lesních dřevin. W: Kontrola kvality reprodukčního materiálu lesních dřevin. Sborník referátů z celostátního odborného semináře s mezinárodní účastí. Opočno, 7-8.3.2000.
- Ram C., Wiesner L. E. 1988. Effect of artificial ageing on physiological and biochemical parameters of seed quality in wheat. *Seed Science and Technology* 16: 11-18.
- Ramos K. M. O., Matos J. M. M., Martins R. C. C., Martins I. S. 2012. Electrical Conductivity Testing as Applied to the Assessment of Freshly Collected *Kielmeyera coriacea* Mart. Seeds. *ISRN Agronomy Volume 2012*. DOI: 10.5402/2012/378139.
- Vertucci C. W., Leopold A. C. 1984. Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage. *Plant Physiology* 75: 114-117.

- Załęski A., Aniśko E., Kantorowicz W. 2000. Oznaczanie żywotności nasion drzew i krzewów leśnych metodą kiełkowania. W: Zasady i metodyka oceny nasion w Lasach Państwowych. CILP, Warszawa. 73-96.
- Załęski A., Aniśko E., Kantorowicz W., Sobczak H., Lipińska H., Witowska O., Bodeł M. 2004. Ocena nasion drzew i krzewów leśnych – monitoring obradzania drzew i jakość materiału siewnego. Określanie żywotności nasion buka metodą konduktometryczną. Maszynopis. Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych IBL.
- Załęski A., Aniśko E., Sobczak H., Kantorowicz W. 2000. Oznaczanie żywotności nasion drzew i krzewów leśnych metodą tetrazolinową. W: Zasady i metodyka oceny nasion w Lasach Państwowych. CILP, Warszawa. 97-112.
- Załęski A., Kantorowicz W. 2000. Oznaczanie czystości, masy, wydajności i wilgotności nasion drzew i krzewów leśnych. W: Zasady i metodyka oceny nasion w Lasach Państwowych. CILP, Warszawa. 39-72.
- Załęski A., Witowska O., Aniśko E., Kantorowicz W., Sobczak H., Lipińska H. 2001. Ocena nasion drzew i krzewów leśnych – monitoring obradzania drzew i jakości materiału siewnego. Sprawozdanie naukowe IBL z tematu BLP-201. Maszynopis. Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych IBL.