เอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์แตงกวาจากการเคลือบด้วยดีเอ็นเอ

Seed Identity of Cucumber Seed by DNA Coating

พจนา สีขาว[1] ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์[2] และ บุญมี ศิริ[1]

Potjana Srikaow[1], Piyasak Chaumpluk[2] and Boonmee Siri[1]

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ คือ สร้างความเป็นเอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์เพื่อป้องกันการปลอมหรือลอกเลียนแบบของเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์พ่อแม่ ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืชและไบโอเซ็นเซอร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการสกัด plasmid DNA จากเชื้อไวรัสกุ้ง แล้วนำมาเคลือบเมล็ดพันธุ์แตงกวาโดยใช้ gelatin เป็นพอลิเมอร์ หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์ โดยนำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการเคลือบจำนวน 2 เมล็ด มาจุ่มลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 μL เขย่าเบาๆ นาน 10 นาที เพื่อล้างดีเอ็นเอที่ผิวของเมล็ด และนำน้ำที่ได้ 2 μL ไปตรวจดีเอ็นเอด้วยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR พบว่ามีแถบดีเอ็นเอปรากฏที่ช่องของตัวอย่างที่ได้จากการล้างดีเอ็นเอที่ผิวของเมล็ดที่ถูกเคลือบเช่นเดียวกับแถบของ plasmid DNA ที่ปรากฏ จึงทำให้สามารถบ่งบอกความเป็นเอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์ได้ สำหรับการตรวจสอบคุณภาพในลักษณะต่างๆ ได้แก่ ความงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดที่เพาะในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอไม่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

คำสำคัญ: เมล็ดพันธุ์แตงกวา, เอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์, การเคลือบด้วยดีเอ็นเอ, การปลอมเมล็ดพันธุ์

ABSTRACT

The objective of this experiment was to create seed identity by DNA coating to protect counterfeiting or imitate of inbred line. The experiment was conducted at Transgenic Plant Technology and Biosensor Laboratory, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Cucumber seed were coated with isolation of shrimp virus plasmid DNA as gelatin polymer. Identification of seed was performed by immersing coated seed in 10 μL deionized water for 10 min with gentle agitation and 2 μL of DNA identification. Detection of DNA identifier was carried out based on basic PCR principle. The result showed that banding pattern of coated seed sample appear and same to banding pattern of plasmid DNA. This method could be created the cucumber seed identity. The cucumber seed quality was assessed by seed germination and speed of germination. The result showed that seed coating with DNA did not affect on seed quality.

Key words: cucumber seed, seed identity, DNA coating, seed counterfeiting

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Department of Plant Science and Agricultural Resource, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

1. บทนำ

เมล็ดพันธุ์พืชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญยิ่งด้านการผลิตทางการเกษตรเพราะเมล็ดพันธุ์คือจุดเริ่มต้นของการผลิต หากเกษตรกรได้เลือกใช้เมล็ดพันธุ์ที่ดีมีคุณภาพ โดยเริ่มตั้งแต่อัตราความงอกได้มาตรฐาน มีสิ่งเจือปนหรือพันธุ์ปลอมปนเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ อีกทั้งยังรวมถึงกรรมวิธีการผลิตที่ได้มาตรฐานด้วย ก็จะทำให้เกษตรกรมีโอกาสในความสำเร็จในการผลิตสูง ซึ่งการตลาดเมล็ดพันธุ์ในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมา หลายส่วนงานทั้งภาครัฐและเอกชนหลายๆ บริษัท ได้เข้ามามีบทบาท ในการพัฒนาสายพันธุ์ต่างๆ ให้ก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว และเมล็ดพันธุ์ก็มีคุณภาพสูงขึ้นเรื่อยๆ แต่ขณะเดียวกันก็ยังมีกลุ่มหรือภาคเอกชนบางส่วนยังคงแสวงหาผลประโยชน์จากการค้าเมล็ดพันธุ์โดยไม่คำนึงถึงคุณธรรม จรรยาบรรณ และจริยธรรม เช่น การจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ที่ไม่มีคุณภาพ เมล็ดพันธุ์ปลอมหรือลอกเลียนแบบ ตลอดจนการขโมยเมล็ดพันธุ์ตามแปลงผลิตของบริษัทอื่นๆ รวมทั้งการขโมยสายพันธุ์พ่อแม่อีกด้วย (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย, 2551) จึงนำเทคโนโลยีการเคลือบเมล็ดพันธุ์ (seed coating) มาใช้ ซึ่งเป็นวิทยาการใหม่ทางด้านเมล็ดพันธุ์ที่ได้พัฒนาเทคนิคการเคลือบมาจากอุตสาหกรรมการเคลือบยา เป็นการใช้โพลิเมอร์ที่มีความเหนียวแล้วผสมสารออกฤทธิ์ชนิดต่างๆ สี และสารเติมแต่งมาเคลือบลงบนเมล็ดพันธุ์อย่างบางเบา ยึดติดแน่นกับผิวเมล็ดไม่เกิดการหลุดร่วงและสม่ำเสมอ (Taylor and Harman, 1990) และได้มีการนำเอาดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมมาเคลือบลงบนผิวของเมล็ด ทำให้สามารถระบุเครื่องหมายบนผิวของเมล็ดพันธุ์เพื่อสร้างความเป็นเอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์อันจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์แบบย้อนกลับถึงแหล่งผลิต ชนิดพืช ชนิดพันธุ์ ป้องกันการปลอมปนเมล็ดพันธุ์ และระบุความเป็นเจ้าของเมล็ดพันธุ์ของแต่ละบริษัท เพื่อสร้างองค์ความรู้ และสร้างเทคโนโลยีการเคลือบเมล็ดพันธุ์เพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัด plasmid DNA

เลี้ยงเชื้อไวรัสจากกุ้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB) โดยเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง เมื่อถึงระยะเวลาที่กำหนดจึงนำเชื้อไวรัสจากกุ้งที่บ่มไว้ในตู้บ่มมาสกัด plasmid DNA โดยแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติม Lysozyme 100 µL แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) และเติม Alkaline 200 µL ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) อีกครั้ง แล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม KOAC 150 µL วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม Phenolchloroform 500 µL แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสชั้นบนแล้วเติม propanol ปริมาตรโดยปริมาตร แล้ววางทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หรือจนเห็นตะกอนของดีเอ็นเอแล้วเทสารละลายส่วนใสออกเพื่อเก็บตะกอนของดีเอ็นเอไว้ จากนั้นนำไปล้างด้วย 70% alchohol 1 µL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เท 70% alchohol ออก นำไปอบที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จึงละลายด้วย TE buffer เก็บไว้ที่ตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส และวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาความเข้มข้นและนำไปเคลือบลงบนผิวของเมล็ดพันธุ์ต่อไป

2.2 การเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย DNA

ละลาย 1% gelatin 10 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร โดยอุ่นในน้ำร้อน แล้วเติม plasmid DNA ที่สกัดได้จากข้อ 1 ปริมาตร 5 μL ลงใน gelatin ที่ละลายไว้ จากนั้นจึงนำไปเคลือบลงบนผิวของเมล็ดพันธุ์แล้วนำเมล็ดไปผึ่งในที่ร่มให้แห้งจนกระทั่งเมล็ดพันธุ์แตงกวามีความชื้นอยู่ในระดับเดิม แล้วนำไปตรวจสอบการเคลือบติดของดีเอ็นเอที่ผิวเมล็ดและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในลักษณะต่างๆ ได้แก่ ความงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ที่เพาะในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 ความงอกของเมล็ดเมื่อเพาะในห้องปฏิบัติการ

โดยสุ่มนับเมล็ดพันธุ์แตงกวาจำนวน 50 เมล็ดต่อซ้ำ วางบนกระดาษเพาะที่ซ้อนกันอยู่ 2 ชั้น แล้ววางกระดาษเพาะปิดด้านบนเมล็ดอีก 1 ชั้น จากนั้นนำไปไว้ในตู้เพาะที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25-30 องศาเซลเซียส และประเมินผลของความงอกหลังเพาะเมื่ออายุ 4 และ 8 วัน โดยการตรวจนับต้นกล้าที่งอกปกติ (normal seedling) (ISTA, 2008)

2.2.2 ความเร็วในการงอกของเมล็ด

ISTA (2008) ได้กำหนดวิธีการหาค่าความเร็วในการงอกของเมล็ดที่เพาะในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถคำนวณจากสูตร

$$\text{ความเร็วในการงอก} = \left(\frac{\text{จ.น.ต้นกล้าปกติ 4 วันหลังเพาะ}}{\text{จ.น.วันที่ตรวจนับครั้งแรก (4 วัน)}} + \cdots\cdots \frac{\text{จ.น.ต้นกล้าปกติ 8 วันหลังเพาะ}}{\text{จ.น.วันที่ตรวจนับครั้งสุดท้าย (8 วัน)}} \right)$$

2.3 การตรวจสอบการเคลือบติดของดีเอ็นเอที่ผิวเมล็ด

นำเมล็ดที่ผ่านการเคลือบด้วยดีเอ็นเอจำนวน 2 เมล็ด มาจุ่มลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 μL เขย่าเบา ๆ เป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อล้างดีเอ็นเอที่ผิวของเมล็ด และนำน้ำที่ได้ 2 μL ไปตรวจดีเอ็นเอ ด้วยหลักการทางยีนเซ็นเซอร์ โดยใช้ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที จากนั้นแบ่งดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณแล้วเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปตรวจสอบผลผลิตของดีเอ็นเอบน 3% agarose gel ในสารละลาย 1x TAE กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ที่อุณหภูมิห้อง ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่องดูเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV Transilluminator และส่วนที่สองนำไปตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอ โดยการเติม cyber green ปริมาตร 15 μL แล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV Transilluminator เช่นเดียวกัน

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์แตงกวาที่เพาะในห้องปฏิบัติการ โดยสุ่มนับเมล็ดจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 50 เมล็ด แล้วประเมินผลของความงอกหลังเพาะเมื่ออายุ 4 และ 8 วัน โดยการตรวจนับต้นกล้าที่งอกปกติและหาค่าความเร็วในการงอกของเมล็ด (ISTA, 2008) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย least significant different (LSD) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SAS (statistical analysis system version 9.1)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การตรวจสอบการเคลือบติดของดีเอ็นเอที่ผิวเมล็ด

จาก Figure 1 ช่องที่ 1 คือ ตัวควบคุมที่เป็นลบ (NTC) โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม ช่องที่ 2 คือ ตัวควบคุมบวก (PTC) ซึ่งใช้ plasmid DNA เป็นตัวควบคุม ช่องที่ 3 คือ ตัวควบคุมการทดลอง (T_0) และช่องที่ 4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ (T_1) ซึ่งได้จากการล้างดีเอ็นเอที่ผิวของเมล็ดที่ถูกเคลือบด้วยดีเอ็นเอ จากการทดลองเมื่อนำไปตรวจสอบผลผลิตของดีเอ็นเอบน 3% agarose gel ในสารละลาย 1x TAE กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ที่อุณหภูมิห้อง ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์

เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วส่องดูเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV Transilluminator พบว่ามีแถบปรากฏที่ PTC และ S ซึ่งเป็นแถบที่มีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการเรืองแสงของดีเอ็นเอ จึงทำให้เห็นว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยดีเอ็นเอที่ผิวของเมล็ดนั้น มีดีเอ็นเอเคลือบติดอยู่ที่ผิวเมล็ด และสามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นการเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอจึงบ่งบอกถึงเอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์ ป้องกันการปลอมปน และระบุความเป็นเจ้าของแต่ละบริษัทได้ (Figure 1 และ Figure 2) เช่นเดียวกันกับ ปิยะศักดิ์ (2552) ได้ศึกษาดีเอ็นเอบอกเอกลักษณ์สำหรับการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 1 และการตรวจวัดด้วยยีนเซ็นต์เซอร์ พบว่าเฉพาะเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอเท่านั้นที่ตรวจสอบพบโมเลกุลของดีเอ็นเอบอกเอกลักษณ์ นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีสำหรับธุรกิจเมล็ดพันธุ์มาใช้ ได้แก่ Audio MarQ ซึ่งเครื่องมือใช้ตรวจสอบความเป็นเจ้าของเมล็ดด้วยเสียง โดยเมล็ดต้องผ่านการเคลือบด้วยสารที่เป็นเครื่องหมาย (marker) ของบริษัทนั้น ๆ สามารถตรวจสอบผ่านพลาสติก กระดาษ ถุงกระสอบ และยังสามารถตรวจสอบเมล็ดเดี่ยวๆ หลังปลูกในแปลงได้นานถึง 8 สัปดาห์ (ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2551)

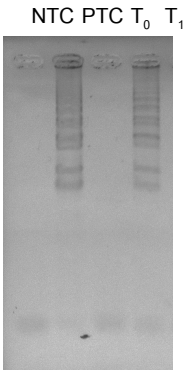

Figure 1 Gel electrophoresis of DNA coated on cucumber seed. (NTC: negative control, PTC: positive control, T_0: control, T_1: sample)

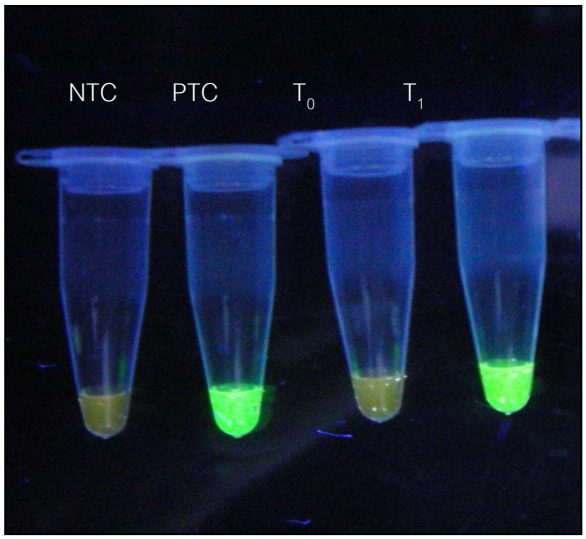

Figure 2_Fluorescence of DNA coated on cucumber seed. (NTC: negative control, PTC: positive control, T_0: control, T_1: sample).

3.2 การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์หลังการเคลือบด้วยดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์แตงกวาหลังจากเคลือบเมล็ดด้วยดีเอ็นเอ พบว่า เมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการเคลือบด้วย gelatin เพียงอย่างเดียว และเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย gelatin ร่วมกับดีเอ็นเอ ไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์เมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้เคลือบสาร และเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย gelatin ร่วมกับดีเอ็นเอมีความงอกของเมล็ดพันธุ์เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนความเร็วในการงอกของเมล็ดนั้น พบว่าเป็นไปในทางเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดที่ตรวจสอบหลังจากการเคลือบเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยดีเอ็นเอ และไม่พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน (Table 1) สอดคล้องกับงานทดลองของ Ming *et al*. (2004) ที่ได้พบว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์แตงกวาไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดและจำนวนของต้นกล้า เช่นเดียวกันกับ ธีรศักดิ์ และ ปริยานุช (2552) ที่รายงานว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์แตงกวาไม่มีผลต่อความงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากลักษณะพื้นผิวเปลือกของเมล็ดพันธุ์แตงกวาที่เรียบและลื่น อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการยึดเกาะของสารเคลือบ ซึ่งสารเคลือบอาจจะหลุดออกมาหรือละลายได้ง่าย จึงทำให้เมล็ดแตงกวาที่เคลือบและไม่เคลือบมีอัตราการดูดน้ำที่ใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดกระบวนการต่างๆ ภายในเมล็ด เช่น การดูดน้ำของโปรตีน การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ การหายใจ การสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่และการยืดตัวของเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงไปสู่เอ็มบริโอที่มีเมทาบอลิซึมสูง และเกิดการเคลื่อนย้ายอาหารละสมในเมล็ด จนเข้าสู่กระบวนการงอกและเจริญเติบโต (Bewley and Black, 1985) ได้ไม่แตกต่างกันระหว่างเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบและไม่เคลือบสาร

Table 1 Seed germination (%) and speed of germination under laboratory conditions of cucumber seed after DNA coated.

Treatment	Seed germination (%)	Speed of germination
Non-coated	70.00	17.41
Gelatin coated	64.66	15.41
Gelatin with DNA coated	73.33	18.08
F-test	ns	ns
CV (%)	13.69	14.43

ns: nonsignificant

4. สรุปผลการทดลอง

การเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอลงบนผิวเมล็ดเป็นการสร้างความเป็นเอกลักษณ์ของเมล็ดพันธุ์ ทำให้สามารถตรวจสอบเมล็ดพันธุ์แบบย้อนกลับถึงแหล่งผลิต ชนิดพืช ชนิดพันธุ์ ระบุความเป็นเจ้าของเมล็ดพันธุ์ของแต่ละบริษัท และป้องกันการปลอมปนเมล็ดพันธุ์ได้ โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งการเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอไม่มีผลต่อความงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์

5. คำนิยม

โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัย อาคารปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และห้องปฏิบัติการการทรานสเจนิคเทคโนโลยีในพืชและไบโอเซ็นเซอร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง

6. เอกสารอ้างอิง

ธีรศักดิ์ แสงเพ็ง และ ปริยานุช จุลกะ. 2552. ผลของการเคลือบต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์แตงกวาและพริก. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 41(1): 329-332.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2552. ดีเอ็นเอบอกเอกลักษณ์สำหรับการเคลือบเมล็ดและการตรวจวัดด้วยยีนเซ็นต์เซอร์. **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8**. 6-9 พฤษภาคม 2552 ณ โรงแรม ดิ เอ็มเพลส อ.เมือง จ.เชียงใหม่.

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2551. ก้าวล้ำกับเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์. แหล่งที่มา: http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04-plant/plant-ku/plant_00.html, 26 กุมภาพันธ์ 2552.

สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย. 2551. เก็บมาเล่า: ป้าย.... "ร้านจำหน่ายเมล็ดพันธุ์คุณภาพ" อีกหนึ่งความพยายาม ยกมาตรฐานอุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์. **มติชนบท เทคโนโลยีชาวบ้าน** 21(443): 70.

Bewley, D.J. and M. Black. 1985. **Seed: Physiology of Development and Germination**. Plenum Press. New York and London.

ISTA. 2008. **International rules for seed testing. International Seed Testing Association**, Bassesdorf, Switzerland.

Ming, L., C. Liming and W. Wenjuan. 2004. Effects of Seed Coating on Germination and Seedling Quality of Cucumber Seeds. **Acta Agriculture Shanghai** 20(1): 72-74.

Taylor, A.G. and G.E. Harman. 1990. Concept and Technologies of Selected Seed Treatments. **Annu. Rev. Phytopathol**. 28: 321-33