การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด

Plant Regeneration from Callus-derived Hypocotyl of Pasture Legume *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] วิชุดา พิริยพลพงศ์[1] ศุภลักษณ์ มั่นไทย[1] ศรัณย์ สุขวัฒน์[1] และจันทกานต์ อรณนันท์[2]

Anurug Poeaim[1], Wichuda Piriyapolpong[1], Supaluk Monthai[1], Sarun Sukhawat[1] and Jantakarn Arananant[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเกิดเป็นต้นใหม่โดยใช้ส่วนของไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด โดยนำไฮโพคอทิลไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่า ไฮโพคอทิลสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกสูตรอาหาร แต่สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 57.09 ตารางมิลลิเมตร จากนั้นนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดเป็นต้น โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าที่ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดคือ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส 3.5 ยอด และสามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า IBA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด โดยมีการพัฒนาเป็นรากได้ 70 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 13.71 ราก และสามารถย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

คำสำคัญ : ถั่วอาหารสัตว์ ถั่วคาวาลเคด ไฮโพคอทิล แคลลัส การเกิดต้นใหม่

ABSTRACT

In the present study we optimized the initial callus and regeneration protocol by using hypocotyl derived explants of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. Hypocotyls explants were cultured onto MS medium supplemented with 0.5 1 3 and 5 mg/l 2,4-D for 8 weeks. Callus proliferation could be obtained from any of media tested but the best results which the largest callus pieces of 57.09 mm^2 obtained was MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D. The callus explants were the subjected to the step of shoot using MS medium supplemented with BA at the concentration of 0.5 1 3 and 5 mg/l. After 8 weeks of culture period, the results showed that the best media for shoot regeneration was MS medium supplemented with 3 mg/l BA. The percentage of regenerated callus pieces were

[1] ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

[2] กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ต. บางกะดี อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

70% and the number of shoots per callus piece was 3.5 shoots and these were the highest number among all the media tested. Shoot were then, transferred onto MS medium supplemented with IBA at the concentration of 0.5 1 3 and 5 mg/l for root induction. The results demonstrated that the suitable media for root induction was MS medium supplemented with 3 mg/l IBA. This medium could yield 70% rooted shoots and the average number of roots per shoot was 13.71 roots. Latter, the plantlets with fully developed roots were successfully transplanted in to soil.

Keywords : pasture legume Cavalcade hypocotyl callus plantlet regeneration

E-mail : kpanurug@kmitl.ac.th

คำนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งโคเนื้อและโคนมนั้นได้มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาสำคัญที่ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรคือการขาดพืชอาหารสัตว์ที่ให้ผลผลิตและมีคุณภาพที่ดี พืชอาหารสัตว์ตระกูลถั่วจัดเป็นแหล่งอาหารหยาบที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากเป็นพืชที่ให้คุณค่าทางอาหารสัตว์สูง (สายัณห์, 2540) และเนื่องจากมีระบบรากไม่ลึกอยู่บริเวณผิวดินเท่านั้น รากที่แผ่ขยายในดินนี้เมื่อตายไปจะสามารถช่วยเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุให้กับดินได้โดยปรับปรุงโครงสร้างของดิน และช่วยลดการเกิดการกร่อนดิน เช่น การชะล้างธาตุอาหาร การไหลบ่าของน้ำ รวมทั้งช่วยเก็บรักษาความชื้นของน้ำในดิน (นงลักษณ์, 2541 และสายัณห์, 2540) ถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ อเมริกากลาง และหมู่เกาะคาริบเบียน นำเข้าประเทศไทยครั้งแรกโดยกรมปศุสัตว์ในปี 2523 แต่ปลูกไม่แพร่หลายนัก และกรมปศุสัตว์ได้นำเข้าอีกครั้งในปี 2540 จากประเทศออสเตรเลีย (กองอาหารสัตว์, 2542) เป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเมื่อตัดถั่วที่อายุ 45 วัน มีโปรตีนประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ วัตถุแห้ง 91 เปอร์เซ็นต์ (กองอาหารสัตว์, 2540)

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วอาหารสัตว์มีหลายรายงาน เช่น Meijer, 1982 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนไฮโพคอทิลของถั่ว *Stylosanthes humilis* บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร Bovo และคณะ (1986) ชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่ว *Lotononis bainesii* โดยใช้ส่วนของใบเลี้ยง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุดบนอาหารที่ประกอบด้วย NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร Godwin และคณะ (1987) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่ว *Stylosanthes scabra* Vog จากส่วนของใบโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Angelon และคณะ (1992) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นของถั่ว *Centrosema brasilianum*, *C. arenarium*, *C. macrocarpum*, *C. pascuorum*, *C. pubescens* และ *C. virginianum* พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้บนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมนี้ แคลลัสของ *C. brasilianum* สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เพียงชนิดเดียว

สำหรับประเทศไทยมีข้อมูลการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ถั่วคาวาลเคดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การศึกษาเทคนิคโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นพื้นฐานอันสำคัญในการช่วยปรับปรุงและขยายพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ต่อไป ดังนั้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยใช้ส่วนของไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเมล็ดของถั่วคาวาลเคดในสภาพปลอดเชื้อ

คัดเลือกเมล็ดถั่วคาวาลเคดที่มีความสมบูรณ์มาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog,1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

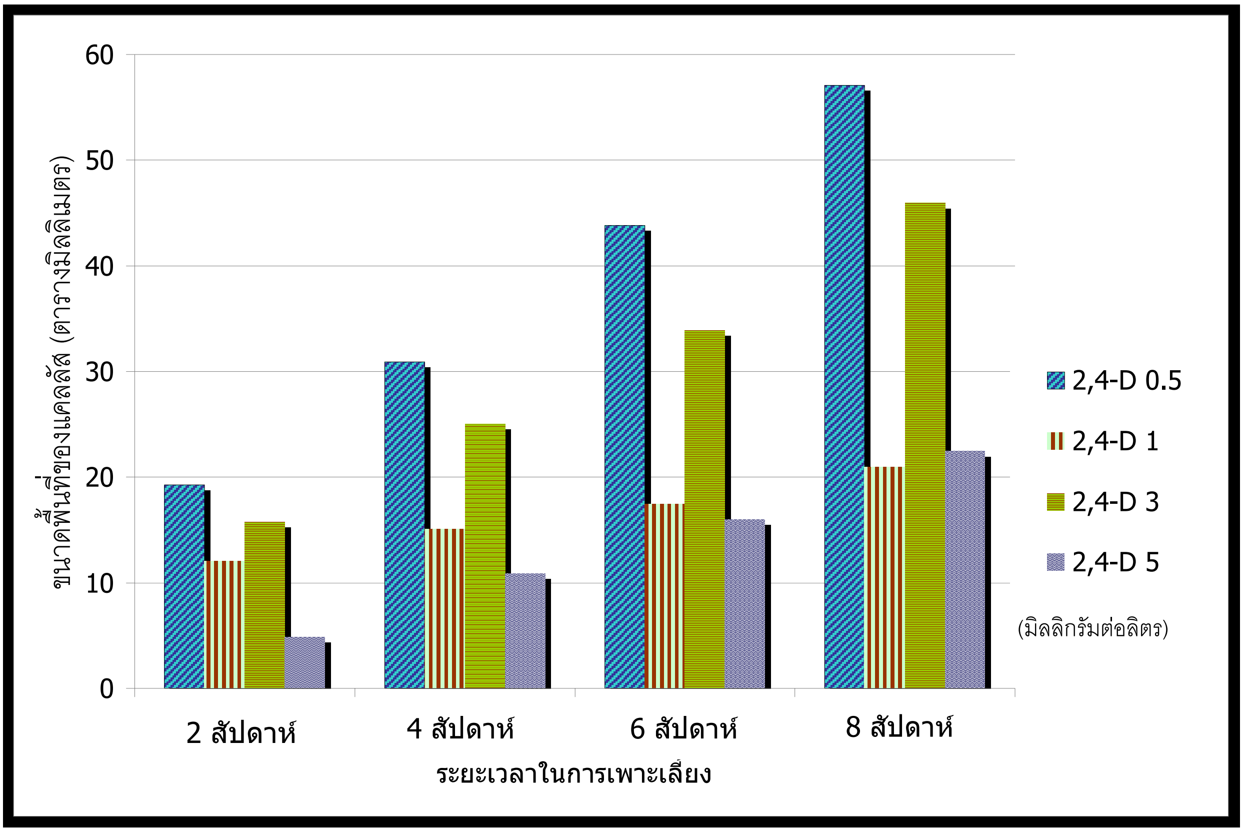
การชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่

นำส่วนของไฮโพคอทิลที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ ยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 7 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดพื้นที่ของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร จากนั้นนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้นมาชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 7 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และนับจำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดขึ้น แล้วนำต้นใหม่ที่เกิดขึ้นมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนต้นที่มีการพัฒนาของราก และนับจำนวนรากที่เกิดขึ้นทั้งหมดของอาหารแต่ละสูตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำเมล็ดของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมล็ดสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้ (ภาพที่ 2ก) จากนั้นเมื่อนำต้นอ่อนที่ได้มาตัดเอาเฉพาะส่วนของไฮโพคอทิลมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไฮโพคอทิลสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกระดับความเข้มข้น แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะแข็ง เกาะกัน

เป็นก้อน (compact callus) มีสีเขียว (ภาพที่ 2ข) โดยอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด มีขนาดพื้นที่ของแคลลัสเฉลี่ย 57.09 ตารางมิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 1) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Godwin และคณะ (1987) ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่ว *Stylosanthes scabra* Vog. ได้บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Meijer (1982) ที่รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไฮโพคอทิลของถั่ว *Stylosanthes humilis* บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) และมีสีเขียวอ่อน



ภาพที่ 1 ผลของ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้บนอาหารทุกสูตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แต่มีการพัฒนาเป็นยอดที่ต่างกันคือ เกิดยอดได้ 40 45 70 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยอาหารสูตรที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดคือ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสมากที่สุดคือ 3.5 ยอดต่อแคลลัส (ภาพที่ 2ค) ซึ่งผลการชักนำให้เกิดยอดนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Meijer (1982) ที่พบว่าสามารถชักนำแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่ว *Stylosanthes humilis* ให้พัฒนาเป็นต้นได้ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พัฒนา

เป็นต้นได้ 78 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Godwin และคณะ (1987) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสของถั่ว *Stylosanthes scabra* Vog. ให้พัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

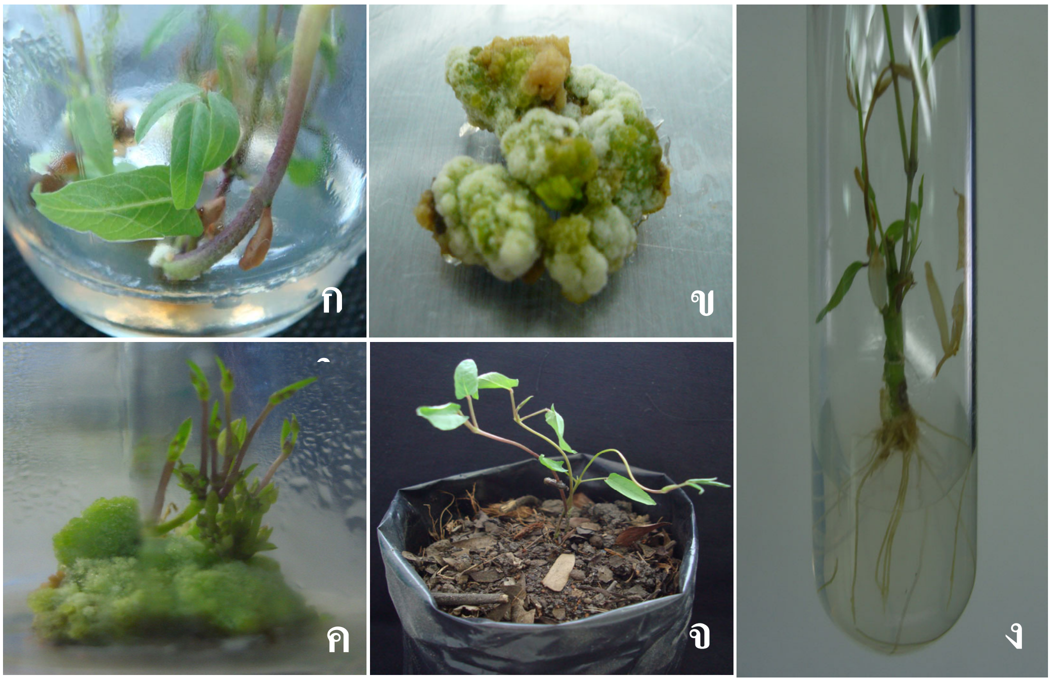
ตารางที่ 1 ผลของ BA ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์

BA (มก/ล.)	จำนวนชิ้นแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด	จำนวนยอดที่เกิดขึ้นทั้งหมด	จำนวนยอดต่อแคลลัส
0.5	20	40	14	1.75
1	20	45	15	1.66
3	20	70	49	3.5
5	20	65	28	2.15

เมื่อนำยอดที่พัฒนาจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 70 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนรากต่อต้นเฉลี่ย 13.71 ราก เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2ง) จากการทดลองนี้สามารถนำต้นถั่วคาวาลเคดที่มียอดและรากที่สมบูรณ์ ย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ (ภาพที่ 2จ) ซึ่งงานวิจัยเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดรากในถั่วอาหารสัตว์นี้มี รายงานของ กิริยา (2547) และ ขนิษฐา (2547) ที่รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดรากจากการเพาะเลี้ยงยอดของถั่วฮามาต้าบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 40 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ผลของ IBA ต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

IBA (มก/ล.)	จำนวนยอดที่เพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากที่เกิดขึ้นทั้งหมด	จำนวนรากต่อต้น
0.5	10	70	14	2
1	10	0	0	0
3	10	70	96	13.71
5	10	0	0	0



ภาพที่ 2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคดและการพัฒนาเป็นต้นใหม่

ก. ต้นอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ ที่เจริญมาจากการเพาะเมล็ดถั่วคาวาลเคดในสภาพปลอดเชื้อ

ข. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเกิดรากได้

จ. ต้นที่มียอดและรากที่สมบูรณ์ที่ย้ายปลูกลงดิน

สรุปผลและเสนอแนะ

เมื่อนำส่วนไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไฮโพคอทิลสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกสูตรอาหาร แต่อาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือสูตรที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 57.09 ตารางมิลลิเมตร และสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นมากที่สุด 70 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส 3.5 ยอด และเมื่อนำยอดที่เกิดขึ้นมาชักนำให้เกิดรากโดยใช้อาหารสูตรเติม IBA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 70 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น 13.71 ราก และต้นที่มียอดและรากสมบูรณ์สามารถย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547. ระบบถ่ายยืนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กองอาหารสัตว์. 2540. เอกสารทางวิชาการกรมปศุสัตว์. งาน B.O.I. เมืองทองธานี, กรุงเทพ ฯ.

กองอาหารสัตว์. 2542. รายงานการวิจัยประจำปี 2542. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพ ฯ.

ขนิษฐา บุรมย์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วฮามาต้าและหญ้ารูซี่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ วิบูลสุข. 2541. การปรับปรุงดินโดยใช้ถั่วฮามาต้า. ปฐพีสาร กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพ ฯ.

สายัณห์ ทัดศรี. 2540. พืชอาหารสัตว์เขตร้อนการผลิตและการจัดการ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

Angelon, P.N. , Rey. H.Y., and Mroginski, L.A. 1992. Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Centrosema brasilianum*. **Plant Cell Rep**. 11:519-521.

Bovo, O. A., Mroginski, L. A. and Rey, H. Y. 1986 Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Lotononis bainessi*. **Plant Cell Rep**. 5:295-297.

Godwin, I.D., Gordon, G.H. and Cameron, D. F. 1987. Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra* Vog. **Plant Cell Tiss Organ Cul**. 9:3-8.

Meijer, E.G.M. 1982. High-frequency plant regeneration from hypocotyls and leaf derived tissue culture of tropical legume *Stylosanthes humilis*. **Plant Physiol**. 56:381-385.

Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. 15:473–497.