การขยายพันธุ์คำฝอย (*Carthamus tinctorius* Linn.) ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของการผลิตกรดไขมัน

นายอนุพันธ์ กงบังเกิด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-230-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16752004

MICROPROPAGATION OF *Carthamus tinctorius* Linn. BY TISSUE CULTURE TO IMPROVE FATTY ACID PRODUCTION

Mr. Anupan Kongbangkerd

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-230-1

Thesis Title MICROPROPAGATION OF *Carthamus tinctorius* Linn. BY TISSUE CULTURE TO IMPROVE FATTY ACID PRODUCTION.

By Mr. Anupan Kongbangkerd

Programme Biotechnology

Thesis Advisor Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Thesis Co-Advisor Associate Professor Pairoh Pinpanichakarn, Ph.D.

Thesis Co-Advisor Associate Professor Naline Nilubol, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Santi Thoongsuwan
..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Tungsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Pairoh Pinpanichakarn, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Naline Nilubol, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Hunsa Punnapayak, Ph.D.)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อนุพันธ์ กงบังเกิด : การขยายพันธุ์คำฝอยด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของการผลิตกรดไขมัน (MICROPROPAGATION OF *Carthamus tinctorius* Linn. BY TISSUE CULTURE TO IMPROVE FATTY ACID PRODUCTION) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สัณห์ พฉิชยกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ รศ.ดร. นลิน นิลอุบล 145 หน้า. ISBN 974-632-230-1

ได้ศึกษาพัฒนาวิธีการชักนำและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของคำฝอย (*Carthamus tinctorius* Linn.) ในระบบ *in vitro* พร้อมทั้ง สภาวะที่เหมาะสมในการหวนกลับคืนเป็นต้น (regeneration) ผลปรากฏว่าแหล่งของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมคือ ใบเลี้ยงส่วนบนที่ตัดขวางผ่านเส้นกลางใบที่ได้จากต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดในสภาวะปลอดเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร โดยทำการเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนนำออกเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง (16/8 hrs. photoperiod). การเสริม NH_4NO_3 (1.65 กรัมต่อลิตร) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS สามารถเพิ่มการชักนำให้เกิดต้นได้ดีขึ้น การเติม $AgNO_3$ (3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือ $CoCl_2$ (5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ลงในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดการกลับคืนเป็นต้นใหม่ได้ สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากคือ การเลี้ยงส่วนต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเต็มสูตร MS ที่ไม่มีการเสริมด้วยฮอร์โมน

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของไขมันและกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อคำฝอยเริ่มต้นและแคลลัสของคำฝอยที่อยู่ในช่วงของการเจริญและพัฒนาโดยใช้เทคนิคทางแก๊สโครมาโทกราฟีพบว่า ผลรวมของระดับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อคำฝอยเริ่มต้น (เมล็ด) คือ กรดโอลิอิค (C18:1) และกรดลิโนเลอิค (C18:2) จะสูงกว่าผลรวมของระดับกรดไขมันอิ่มตัวคือ กรดปาล์มิติค (C16:0) และกรดสเตียริค (C18:0) และพบองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดอื่นในปริมาณที่ต่ำมาก ซึ่งปริมาณสะสมของไขมันภายในเมล็ดคำฝอยจะสูงกว่าปริมาณที่ควรจะพบในใบเลี้ยงอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับของไขมันในใบเลี้ยงจะลดลงเมื่ออายุใบเลี้ยงมากขึ้น และระดับของไขมันในแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืด มีอัตราการเจริญสูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในที่สว่างที่ทุกระยะของการเจริญ และมีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน (total lipid content) สูงสุดที่สัปดาห์ที่ 2 ของการเจริญ โดยกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบทั้งในแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืดและที่สว่าง คือ กรดปาล์มิติค (C16:0) และกรดสเตียริค (C18:0) จากการศึกษาผลกระทบของฮอร์โมนในอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของกรดไขมันพบว่า แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D หรือ NAA ร่วมกับ BA หรือ Kn จะมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยฮอร์โมนชนิดอื่น โดยมีกรดปาล์มิติค (C16:0) เป็นองค์ประกอบหลักในแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย NAA ร่วมกับ BA และกรดลิโนเลอิค (C18:2) เป็นองค์ประกอบหลักในแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D ร่วมกับ Kn แคลลัสคำฝอยที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร จะมีระดับของไขมันรวมสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ และมีกรดปาล์มิติค (C16:0) เป็นองค์ประกอบหลักในไขมันเช่นกัน

ภาควิชา .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C526419 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : *Carthamus tinctorius* Linn./ FATTY ACID PRODUCTION/ TISSUE CULTURE
ANUPAN KONGBANGKERD : MICROPROPAGATION OF *Carthamus tinctorius* Linn. BY TISSUE CULTURE TO IMPROVE FATTY ACID PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH PINPANICHAJAKUL, Ph.D. AND ASSO. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. 145 pp. ISBN 974-632-230-1

The procedures for callus induction and plant regeneration from tissues and callus of *Carthamus tinctorius* Linn. cv. *manjira* were studied and developed. The optimal conditions for callus induction and plant regeneration were observed when transversely cut-upper part of 14 days old cotyledons were previously incubated for 2 weeks in the dark on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA and 2.0 %(w/v) sucrose. Addition of 1.65 g/l NH_4NO_3 could facilitate shoot formation from cultured cotyledon callus. The presence of $AgNO_3$ (3.0 mg/l) or $CoCl_2$ (5.0 mg/l) in MS medium supplemented with optimal plant growth regulators also enhanced the yield of shoot formation. Root induction was occurred on full-strength MS medium without plant growth regulators.

Total lipid and fatty acid compositions of *Carthamus tinctorius* Linn. tissues and callus were also studied and analysed by gas chromatography (GC). Palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2) were detected in the developmental stages of natural explants and callus tissues. Furthermore, the total lipid contents of explants were remarkably high in seeds and gradually decreased in cotyledon explant. The main fatty acid components found in natural explants were unsaturated fatty acids (C18:1 and C18:2) which were higher than that of saturated fatty acids (C16:0 and C18:0). The growth rate of dark grown cotyledon callus was higher than that of light grown callus. Maximum content of total lipid was observed at the second weeks of culture. The main fatty acids found in both type of calli were palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0). MS medium supplemented with 2,4-D or NAA at 0.5 mg/l in combination with BA or Kn in MS medium yielded higher content of total lipid than that with other auxins. The highest level of palmitic acid (C16:0) was detected in callus grown in MS medium containing NAA plus BA while the highest level of linoleic acid (C18:2) was detected in the medium having 2,4-D plus Kn. *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on the medium containing 20 g/l sucrose yielded the highest content of total lipids with palmitic acid (C16:0) as the major saturated fatty acid.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต อนุพันธ์ กองบังเกิด

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his deepest gratitude to his advisor, Associate Professor Dr. Sanha Panichajakul of the department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khonkaen University, and to his co-advisors, Associate Professor Dr. Pairoh Pinpanichakarn and Associate Professor Dr. Naline Nilubol of the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University for their valuable suggestions, keen interest, and helpful guidances throughout the course of this work and thanks to Assistant Professor Dr. Sirirat Rengpipat and Assistant Professor Dr. Hunsa Punnapayak for their improvement of the thesis.

The author would also like to thank Assistant Professor Dr. Amorn Pechsom for help with the GC/MS analysis and fatty acid analysis methods and thanks to Assistant Professor Dr. Mana Sriyudthsak for access to the Gas chromatographic system.

The author would like to thank the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for granting his partial financial support to conduct this investigation, thanks to all staff members of the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering(IBGE), Chulalongkorn University, especially Mr. Narong Homchan for their kindness and helps.

The author would like to thank Mr. Suwit Kuanchom and Mr. Somnuek, Office of Agricultural Economics (OAE), for supplying safflower seeds as a plant materials.

Finally, the author would like to express his deepest appreciation and gratefulness to his parents, for their warmest love, understanding and cheerfulness through his graduate shool.

CONTENTS

Page

Abstract (Thai)..... iv

Abstract (English)..... v

Acknowledgements..... vi

Contents..... vii

List of Tables..... viii

List of Figures..... xi

Abbreviations..... xvii

CHAPTER

I Introduction..... 1

II Materials and Methods..... 12

III Results..... 28

IV Discussion..... 97

CONCLUSION..... 111

REFERENCES..... 114

APPENDIX..... 124

VITA..... 145

LIST OF TABLES

Table		Page
1	*In vitro* regeneration studies on some plant species.....	8
2	The percentage of contamination of *Carthamus tinctorius* Linn. seeds at various surface sterilized conditions.....	30
3	Effect of plant growth regulators on callus induction efficiency of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledons.	33
4	Effect of light and plant growth regulators on the external morphology of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus	34
5	Effect of dark pre-incubation periods on callus induction and shoot regeneration of explants from *Carthamus tinctorius* Linn.	37
6	Effect of dark pre-incubation periods and types of explants on the callus and external morphology of *Carthamus tinctorius* Linn. tissue culture.	38
7	Effect of direction of excised cotyledons and hypocotyl segments on growth and external morphology of *Carthamus tinctorius* Linn. callus.	41
8	Effect of seedling maturity on callus induction and shoot regeneration of *Carthamus tinctorius* Linn.	44
9	Influence of growth media on growth and morphogenetic response of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus.	47
10	Effect of types of plant growth regulators on the morphogenetic response of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus.	49
11	Effect of ammonium nitrate and potassium nitrate on the external morphology of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus.	56

Table		Page
12	Effect of ammonium nitrate and potassium nitrate concentrations on plant regeneration of *Carthamus. tinctorius* Linn. cotyledon callus.	57
13	Effect of ammonium nitrate on the external morphology of *Carthamus tinctorius* Linn. regenerated callus.	58
14	Effect of silver nitrate and cobalt chloride on the external morphology of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus.	64
15	Effect of silver nitrate and cobalt chloride on callus induction and plant regeneration of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus.	65
16	Effect of silver nitrate on the external morphology of callus regenerated from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledons.	66
17	Effect of cobalt chloride on the external morphology of callus regenerated from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledons.	67
18	Effect of sucrose concentration on the external morphology of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus.	71
19	Effect of sucrose concentration on callus induction efficiency from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus, cultured on MS medium containing 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA at the 4th week after culturing.	73
20	Influence of sucrose concentration on growth index of the cotyledon callus of *Carthamus tinctorius* Linn.	75
21	Total lipid contents (%w/w) of developmental and callus stages of *Carthamus tinctorius* Linn.	77

Table		Page
22	Changing in fatty acid composition of total lipid of dark grown callus at the growth period (µg/g dry weight).	85
23	Changing in fatty acid composition of total lipid of light grown callus at the growth period (µg/g dry weight).	86
24	Total lipid content of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various combination (cytokinins/auxins).	88

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The principle methods of micropropagation.	6
2	The illustration of excised cotyledons and hypocotyl segments for studying the effect of explant excision direction on callus induction and plant regeneration.	17
3	The method for lipid extraction from plant tissues.	25
4	Lipid esterification method for GC analysis.	26
5	The percentage of *Carthamus tinctorius* Linn. seeds germination after being stored in the cold room (5-10 ^{o}C) for a long period.	29
6	Induction of callus regeneration from cotyledon explants of *Carthamus tinctorius* Linn. on MS medium supplemented with different levels of plant growth regulators (NAA and BA).	32
7	Effect of light pre-incubation time and plant growth regulators (NAA and BA) on plant regeneration.	35
8	Shoot regeneration of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledons after culturing for 2 weeks in the dark on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA and transferring to 16/8 hrs. photoperiod for 50 days.	39
9	Effect of direction of excision explant segments on callus induction and plant regeneration at the period of 4 weeks after culturing on MS medium containing 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA.	40
10	Induction of callus from various ages of cotyledon explants cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA at the period of 4 weeks after culturing.	43

Figure		Page
11	Shoot regeneration from the 14 days old-seedlings cotyledon callus when cultured on hormone free full-strength MS medium for root induction.	46
12	Influence of the types of media on callus induction and plant regeneration of excised cotyledons and hypocotyl segments.	48
13	Callus induction and plant regeneration from 2 week-dark pre-incubation periods of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various types of plant growth regulators.	50
14	Characteristics of shoots regenerated from *Carthamus tinctorius* Linn. from callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA after 60 days of culturing and transferring to the media promoting root production. (A) hormone free full strength MS medium (B) half strength MS medium contained 0.5 mg/l NAA.....	51
15(a,b)	Callus induction and plant regeneration of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with various concentration of NAA and BA.	53
16	Characteristics of regenerated shoot from cotyledon callus of *Carthamus tinctorius* Linn. cultured on MS medium contained 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA after 60 days of culturing.	55
17	Regenerated callus derived from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon explants cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and BA and various levels of KNO_3 (g/l)	

Figure		Page
	for 4 weeks.	59
18	Regenerated callus derived from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon explants cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and BA and various levels of NH_4NO_3 (g/l) for 4 weeks.	60
19	Plantlets regenerated from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon calli after cultured on hormone free full-strength MS medium. ..	62
20	Characteristics of regenerated shoot from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA 0.5 mg/l BA and 1.65 g/l NH_4NO_3 after 60 days and transferred to the media for root induction: (A) half strength MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA 0.1 mg/l BA and 6.0%w/v sucrose. (B) half strength MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA 0.5 mg/l GA_3 and 1.0 g/l chacoal.	63
21	Characteristics of regenerated shoot from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA 0.5 mg/l BA and 3.0 mg/l $AgNO_3$ after 60 days and transferred to the media for root induction: (A) half strength MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l GA_3 (B) immersion an excised shoots in 1.0 mg/l IBA solution for 2 hrs. before transferred to hormone free full-strength MS medium.	68

Figure		Page
22	Characteristics of regenerated shoot from *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA 0.5 mg/l of BA and 5.0 mg/l $CoCl_2$ after 60 days and transferred to half strength MS medium contained with 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l GA_3 for root induction.	69
23	Characteristics of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA and various concentration of sucrose for 4 weeks....	72
24	Effect of sucrose concentration on callus induction efficiency of *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus at the period of 6 weeks interval.	74
25	Changing in fatty acid components at soaked seeds stage.	78
26	Changing in fatty acid components at cotyledon 7 days old seedlings stage.	78
27	Changing in fatty acid components at cotyledon 14 days old seedlings stage.	79
28	Changing in fatty acid components at excised cotyledon 14 days after culturing stage.	79
29	Changing in fatty acid components at excised cotyledon 28 days after culturing stage.	80
30	Changing in fatty acid components at callus subculturing I stage.	80
31	Changing in fatty acid components at callus subculturing II stage.	81
32	Changing in fatty acid components at callus subculturing III stage.	81
33	Changing in fatty acid components at callus subculturing IV stage.	82
34	Changing in fatty acid components at callus subculturing V stage.	82

Figure		Page
35	Growth patterns and total lipid synthesis of cotyledon-derived callus. Culture carried out in MS basal media under 2000 lux of fluorescent for 16/8 hrs. photoperiod at 25±2°C.	84
36	Myristic acid (C14:0) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	89
37	Palmitic acid (C16:0) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	89
38	Palmitoleic acid (C16:1) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	90
39	Stearic acid (C18:0) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	90
40	Oleic acid (C18:1) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	91
41	Linoleic acid (C18:2) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed	

Figure		Page
	concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	91
42	Arachidic acid (C20:0) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	92
43	Behenic acid (C22:0) content of *Carthamus tinctorius* Linn. callus cultured on MS medium supplemented with fixed concentration (0.5 mg/l) of various kinds of plant growth regulators.	92
44	Total lipid content in *Carthamus tinctorius* Linn. cotyledon callus as affected by sucrose concentration.	94
45	Palmitic acid (C16:0) content of cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with various sucrose concentration.	95
46	Stearic acid (C18:0) content of cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with various sucrose concentration.	95
47	Linoleic acid (C18:2) content of cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with various sucrose concentration.	96
48	Arachidic acid (C20:0) content of cotyledon callus cultured on MS medium supplemented with various sucrose concentration.	96

ABBREVIATION

B_5	=	Gamborg medium (1970)
MS	=	Murashige and Skoog medium (1962)
N_6	=	Chu medium (1966)
LS	=	Linsmaier and Skoog medium (1965)
HM	=	Hildebrandt medium (1962)
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	=	6-Benzyladenine
NAA	=	α-naphthaleneacetic acid
Kn	=	Kinetin
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
cm.	=	centrimeter(s)
µg	=	microgram(s)
g.	=	gram(s)
mg/l	=	milligram per liter
ml.	=	milliter
hrs.	=	hour(s)
temp.	=	temperature (^{o}C)
v/v	=	volume/volume (concentration)
w/v	=	weight/volume (concentration)
µl	=	microliter(s)
GC	=	Gas chromatography
GC/MS	=	Gas chromatography/Mass spectrometer