

# 应用 311-A 最优回归设计研究 ABA、PEG4000 及 AgNO<sub>3</sub> 对落叶松体细胞胚发生数量的影响

齐力旺\* 韩一凡 李 玲

(中国林科院林业研究所分子遗传室, 北京 100091)

Dietrich Ewald

(Federal Research Centre for Forestry, Institute for Forestry Tree Breeding and Biotechnology,  
Eberswalder Chaussee 6, 15377 Waldsiedersdorf, Germany)

韩素英

(山西农业大学林木生物技术研究中心 太谷 030801)

**摘 要** 采用三因素多项式回归 311-A 最优设计方法对影响落叶松体细胞胚发生数量的 ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 的用量进行了研究,建立了华北落叶松正常体细胞胚发生数量与 ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 的数学模型,分析了落叶松体细胞胚发生数量试验因子的主效应和互作效应,优选了落叶松体细胞胚发生数量最佳结果的最佳技术方案为 ABA 18.9138 mg/L, PEG4000 88.8007 g/L 与 AgNO<sub>3</sub> 10.7513 mg/L 时,最佳体细胞胚数量应为 107.5278 个子叶胚/g. callus。实验结果表明,该方法是在针叶树体细胞胚发生过程中,主要激素种类与浓度配比、处理组合科学、合理的培养基优化途径。

**关键词** 华北落叶松, 311-A 设计, 体细胞胚发生数量, 主效应, 互作效应

中图分类号 Q332 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0084-06

植物体细胞胚胎发生研究中,体细胞胚成熟频率和体细胞胚质量受很多因素的影响,其中,成熟培养基中 ABA、PEG4000、AgNO<sub>3</sub> 等的浓度、配比是影响体细胞胚成熟的主要因素之一,但试验中主导因子以及各因子的主效应、因子间的互作效应很难确定;另外,畸形胚的出现、体细胞胚发生频率低等,可能与不适合的培养基有很大关系,说明总有某个或某些因子用的不正确或浓度不对;凭经验准确量化各因子求得高质量高频体细胞胚的最佳组合,往往繁琐且费时,不一定能取得最佳效果,而实验中多配制一种培养基就增加很大的工作量。311-A 最优回归设计<sup>[6]</sup>的诱人之处就在于依据统计学原理,使实验的工作量小、结果准确、信息量大,并能确立互作效应,取得最佳组合;这在生物工程领域如:组织培养、体细胞胚胎发生、酶工程、发酵工程、分子生物学及基因遗传转化等研究中,有其特殊的意义与用途。

因此,怎样以较少的试验处理组合获得较大信息量与最佳试验结果,是现代高新技术领域提出的一个新课题。本试验在华北落叶松体细胞胚发生数量研究中用 311-A 最优回归设计,以 11 个处理组合的 11 个数据,可获得  $5^3 = 125$  个试验组合的结果与信息量,直接求出该实验的最佳结果,依据实验数据得到一个设计试验结果的曲线图,从图上获得原设计组合以外的浓度梯度和组合,从而使因子梯度是连续的、不间断的,弥补了以往设计中的主要缺点。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

从山西省关帝林区选 30 年生华北落叶松天然母树林,运用优树选择方法,选择 5 株优树单株,依次于 1998 年 6 月 10 日、6 月 20 日、6 月 25 日、7 月 6 日、7 月 15 日,分批、定株采集未成熟球果,经酒精

和升汞溶液轻度消毒后,在超净台剥开种壳,取出未成熟种胚,接种于诱导培养基上,每皿接种 25 个,置于 23~26℃ 下暗培养,获得的胚性愈伤组织,每 18~21d 继代 1 次,两个基因型的落叶松未成熟胚建立了 2A、2B、2C.....2Y 及 3A、3B.....3H 共 33 个稳定的胚性细胞系。本试验中以 3C 细胞系为材料进行 311-A 设计的体细胞胚发生数量的研究。

## 1.2 培养基及培养条件

基本培养基用 S+H (Ewald 1997) 附加 ABA 0~32mg/L、PEG4000 为 0~150g/L、AgNO<sub>3</sub> 0~10mg/L、蔗糖 2.5%、Sigma 公司琼脂粉 0.3%、pH5.8、温度 22±2℃ 黑暗条件下培养。

## 1.3 试验设计

采用 311-A 最优回归设计,ABA、PEG4000、AgNO<sub>3</sub> 浓度为自变量,以落叶松子叶胚发生数量为目标函数。为了使回归关系标准化,消除量纲和自变量取值的影响,对试验因子(自变量)的设计水平进行无量纲线性编码代换,以便把因变量 Y 对自变量的回归关系转化为 Y 对因子空间中坐标轴 X 上编码值的关系,其编码代换列于表 1。

根据 311-A 最优回归设计要求,以自变量编码值相应的浓度,拟订出 11 个浓度处理组合,11 次重复,最后取平均每克胚性愈伤组织上产生的子叶胚

个数进行统计分析。

表 1 自变量水平编码

Table 1 Coding of independent variable level

Independent variable	Change interval	Independent variable level						
		-2	-1.414	-1	0	1	1.414	2
ABA (mg/L) (x <sub>1</sub> )	8	0	4.7		16		27.3	32
PEG 4000 (g/L) (x <sub>2</sub> )	37.5	0	22		75		128	150
AgNO <sub>3</sub> (mg/L) (x <sub>3</sub> )	2.5	0	2.5	5	7.5			10

## 1.4 多项式回归方程的建立

采用各组合的平均数结果建立多项式回归方程,落叶松体细胞胚发生数量与 ABA、PEG 4000 和 AgNO<sub>3</sub> 浓度的关系属非线性相关,故可采用多项式回归模型来表达。

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^3 b_j x_j + \sum_{i < j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^3 b_{jj} x_j^2$$

其中, b<sub>0</sub>: 常数项; b<sub>j</sub>: 一次项回归系数; b<sub>ij</sub>: 交互项回归系数; b<sub>jj</sub>: 二次项回归系数

## 2 结果分析

### 2.1 落叶松体细胞胚发生数量与 ABA、PEG、AgNO<sub>3</sub> 浓度的关系

2.1.1 回归方程的建立: 试验用 311-A 最优回归设计,采用多项式回归模型来表达,试验结果见表 2。

表 2 ABA、PEG、AgNO<sub>3</sub> 组合与体细胞胚数量结果

Table 2 Number of somatic embryos of *Larix principis-rupprechtii* containing different ABA, PEG and AgNO<sub>3</sub> concentration

Treatment No.	ABA (x <sub>1</sub> ) (mg/L)	PEG (x <sub>2</sub> ) (g/L)	AgNO <sub>3</sub> (x <sub>3</sub> ) (mg/L)	No. of embryos (g·callus)	No. of theoretical embryos (g·callus)
1	0 (16)	0 (75)	0 (10)	109.38	105.13
2	0 (16)	0 (75)	-0 (0)	61.11	64.84
3	-1.414 (4.7)	-1.414 (22)	1 (7.5)	54.48	56.47
4	1.414 (27.3)	-1.414 (22)	1 (7.5)	60.26	62.26
5	-1.414 (4.7)	1.414 (128)	1 (7.5)	66.33	67.57
6	1.414 (27.3)	1.414 (128)	1 (7.5)	74.51	75.75
7	0 (32)	0 (75)	-1 (2.5)	66.44	64.17
8	-0 (0)	0 (75)	-1 (2.5)	63.19	60.92
9	0 (16)	0 (150)	-1 (2.5)	23.67	20.58
10	0 (16)	-0 (0)	-1 (2.5)	37.58	35.58
11	0 (16)	0 (75)	-0 (5)	95.56	95.29

根据实验结果与 311-A 最优回归设计建立 ABA、PEG4000、AgNO<sub>3</sub> 各因子与落叶松体细胞胚发生数量的多项式回归方程为:

$$y = 7.0175 + 2.4348x_1 + 1.2310x_2 + 4.2465x_3 + 0.0010x_1x_2 + 0.0415x_1x_3 + 0.0432x_2x_3 - 0.0785x_1^2 - 0.0097x_2^2 - 0.4122x_3^2$$

方程的决定系数为 R<sup>2</sup> = 0.9885, 表明方程各因子与实验结果的拟合效果非常好。

2.1.2 试验因子的主效应分析: 由于设计中各因素处理进行正交编码, 回归方程中的统计值已相对独立, 反映各因子与实验结果的关系时, 只要把其它两个实验因子以零水平处理代入可得到本试验中

ABA( $x_1$ )与体细胞胚发生数量  $\hat{y}_3$ , PEG4000( $x_2$ )与体细胞胚发生数量  $\hat{y}_2$ , AgNO<sub>3</sub>( $x_3$ )与体细胞胚发生数量  $\hat{y}_3$  的 3 个一元二次数学方程为:

$$\hat{y}_1 = 7.0175 + 2.4348x_1 - 0.0785x_1^2$$

$$\hat{y}_2 = 7.0175 + 1.2310x_2 - 0.0097x_2^2$$

$$\hat{y}_3 = 7.0175 + 4.2465x_3 - 0.4122x_3^2$$

由回归方程求出试验中 ABA( $x_1$ )、PEG4000

( $x_2$ )、AgNO<sub>3</sub>( $x_3$ ) 的 5 个处理的体细胞胚发生数量列于表 3。

由图 1 与表 3 变异系数表明, ABA 和 PEG4000 对落叶松体细胞胚发生数量有重要影响, 而 AgNO<sub>3</sub> 的作用较小, 三者均有一个最适宜的处理浓度, 表明在落叶松体细胞胚发生过程中, 应该重视调整培养基中 ABA 和 PEG4000 的含量, 这是非常必要的。

表 3 各试验因子不同处理体细胞胚发生数量

Table 3 Number of somatic embryos per gram embryogenic tissue containing different coding treatment of ABA, PEG and AgNO<sub>3</sub> concentration

Factors	No. of coding treatment							Coef. of variation (CV%)	The highest number of theoretical embryos	
	-2	-1.414	-1	0	1	1.414	2		Factors concentration	NO. of embryos
ABA(mg/L)	7.0175	16.727	21.4719	25.8783	20.2367	14.9823	4.5471	48.82	15.5083	25.8973
PEG 4000(g/L)	7.0175	29.4047	39.5394	44.78	22.7394	5.6607	-26.5825	139.76	63.4536	46.0732
AgNO <sub>3</sub> (mg/L)	7.0175	12.3539	15.0575	17.945	15.68	13.2342	8.2625	30.99	5.1510	17.9544

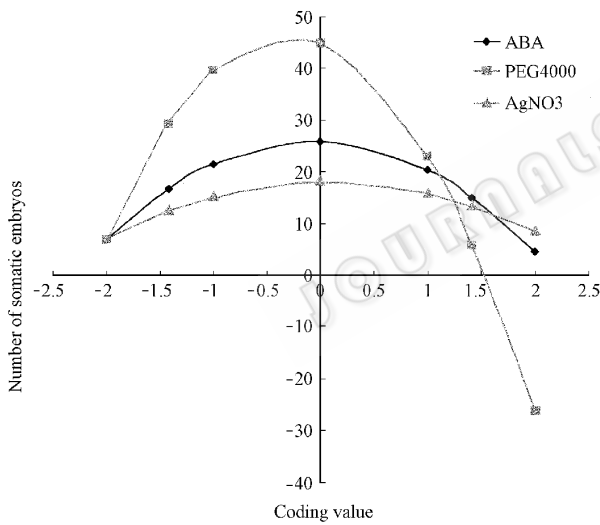


图 1 单因素效应曲线

Fig. 1 Curve of single factor effect

从各试验因子的一元二次方程中, 由  $x_i =$

$\frac{b_i}{-2b_{ii}}$  求得各试验因子体细胞胚发生数量最多时,

相应的实际用量, 结果列于表 3 中。由结果可知, 体细胞胚数量最高时, ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 用量分别为 15.5083mg/L、63.4536g/L 和 5.1510mg/L。但从总的多项式回归方程可知, 试验因子之间有着大小、正负不同的互作效应, 因此仅从主效应分析来选各因子的最佳用量显然是不全面的。下面对试验因子之间一级互作进行剖析。

## 2.2 试验因子间互作效应分析

2.2.1 ABA( $x_1$ )与 PEG4000( $x_2$ )的互作效应分析: 分析 ABA 与 PEG4000 的互作可以从下面回归方程中剖析。

$$\hat{y} = 7.0175 + 2.4348x_1 + 1.2310x_2 + 0.0010x_1x_2 - 0.0785x_1^2 - 0.0097x_2^2$$

我们以 5 种编码处理浓度分别求得 7 种浓度的结果, 以便能够在相同水平下计算变异系数, 故由方程可得 7 种 ABA 浓度和 7 种 PEG4000 浓度处理条件下的实验结果见图 2。

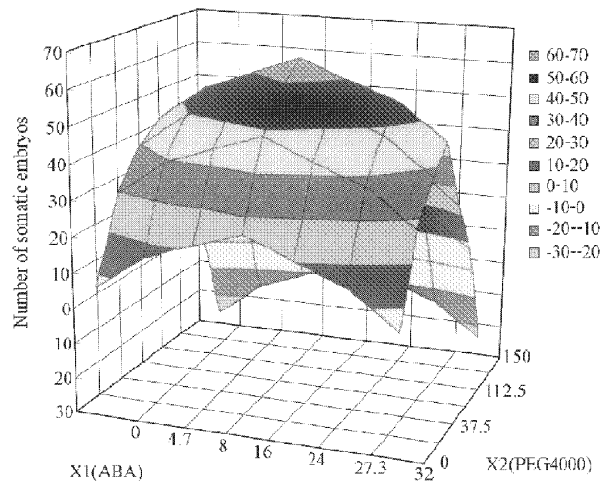


图 2 落叶松体细胞胚发生数量互作效应曲面图

Fig. 2 ABA and PEG4000 mutual effect curved surface chart of larch embryos

由图 2 可知,当 ABA 浓度在 0~16mg/L 范围内,PEG4000 为 0~75g/L,培养基中 ABA 与 PEG4000 的作用二者相辅相成。落叶松体细胞胚发生数量随 ABA 和 PEG4000 浓度的增加而增加;ABA 浓度 16mg/L、PEG4000 浓度 75g/L 时,体细胞胚发生数量可达到 64.841 个/g·callus;若不用 PEG4000 只靠 ABA 浓度为 16mg/L 时,体细胞胚发生数量最高可达 25.8783 个/(g·callus);表中显示,高浓度的 ABA 和高浓度的 PEG4000 均对落叶松体细胞胚发生不利。可见,只有当 ABA 与 PEG4000 合理配合时,才能获得最佳效果。

**2.2.2 ABA( $x_1$ )与 AgNO<sub>3</sub>( $x_3$ )的互作效应分析:** ABA 与 AgNO<sub>3</sub> 对体细胞胚发生数量( $y$ )的回归方程为:

$$\hat{y} = 7.0175 + 2.4348x_1 + 4.2465x_3 + 0.0451x_1x_3 - 0.0785x_1^2 - 0.4122x_3^2$$

ABA 与 AgNO<sub>3</sub> 浓度与体细胞胚发生数量的关系见图 3。

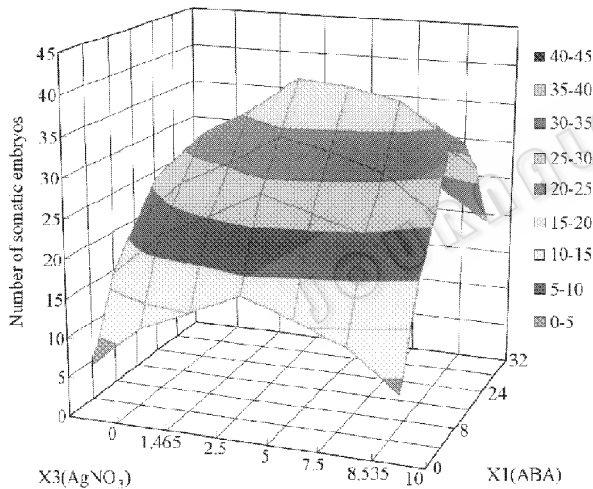


图 3 落叶松体细胞胚发生数量 ABA、AgNO<sub>3</sub> 互作效应曲面图

Fig. 3 ABA and AgNO<sub>3</sub> mutual effect curved surface chart of larch embryos

可见,在图 3 中,AgNO<sub>3</sub> 对体细胞胚发生数量的影响虽比 ABA 和 PEG4000 要小,但在不加 AgNO<sub>3</sub> 时也难获得最高体细胞胚数量;ABA 与 AgNO<sub>3</sub> 对体细胞胚数量的共同作用的基本规律和 ABA 与 PEG4000 对体细胞胚数量的共同作用是一致的。当 AgNO<sub>3</sub> 不变,ABA 浓度由 0 增至 16mg/L 时,体细胞胚数量随 ABA 浓度的增加而增加,同理,当 ABA 不变,AgNO<sub>3</sub> 浓度由 0 增至 5 时,体细胞胚数量随 AgNO<sub>3</sub> 的增加而增加,但效益较低。当

ABA 为 16mg/L,AgNO<sub>3</sub> 为 5mg/L 时,体细胞胚数量由 7.0175 个/(g·callus)提高到 40.126 个/(g·callus),每增 1mg ABA 可增加体细胞胚 2.1 个,每增 1mg AgNO<sub>3</sub> 可增加体细胞胚数量 6.6 个;当 ABA 超过 16mg/L,AgNO<sub>3</sub> 多于 5mg/L 时,体细胞胚数量反而下降,可见 ABA 与 AgNO<sub>3</sub> 也只有合理配合下才能获得最佳结果。

**2.1.3 PEG4000( $x_2$ )与 AgNO<sub>3</sub>( $x_3$ )的互作效应分析:** PEG4000 与 AgNO<sub>3</sub> 对体细胞胚数量的影响可从下面二因子多项式回归方程中获悉:

$$\hat{y} = 7.0175 + 1.2310x_2 + 4.2465x_3 + 0.0432x_2x_3 - 0.0097x_2^2 - 0.4122x_3^2$$

从多项式回归方程中获得的体细胞胚数量结果见图 4。

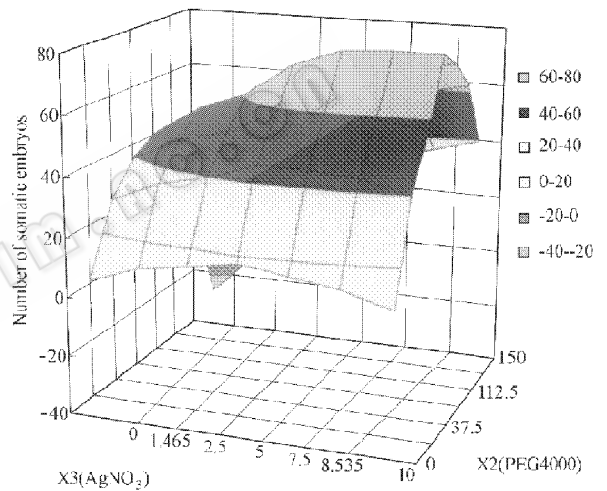


图 4 落叶松体细胞胚发生数量 PEG4000、AgNO<sub>3</sub> 互作效应曲面图

Fig. 4 PEG4000 and AgNO<sub>3</sub> mutual effect curved surface chart of larch embryos

由方程所得图 4 结果显示,PEG4000( $x_2$ )与 AgNO<sub>3</sub>( $x_3$ )之间存在着较大的正互作效应,表明随 PEG4000 浓度的增加相应增加 AgNO<sub>3</sub> 浓度可提高体细胞胚数量,当 AgNO<sub>3</sub> 浓度在 0~10mg/L 范围内,PEG4000 浓度为 0~75g/L,体细胞胚发生数量从 7.0175 个提高到 78.425 个,随 PEG4000 浓度的增加而增加,而过高浓度的 PEG4000 反而会引起体细胞胚数量的减少。若 PEG4000 的浓度小于 75 g/L,AgNO<sub>3</sub> 浓度 0~5mg/L,体细胞胚发生数量随 AgNO<sub>3</sub> 的增加而增加;若 PEG4000 浓度为 75~150g/L 时,AgNO<sub>3</sub> 浓度 0~10mg/L 范围内,随 AgNO<sub>3</sub> 的增加体细胞胚发生数量明显提高,从表中分析,PEG4000 为 75g/L,AgNO<sub>3</sub> 浓度为 10mg/L

是最佳技术组合。

### 2.3 最佳组合方案优选

由于试验因子不但存在着主效应,而且还存在着因子间各种复杂的互作效应,因此很难从主效应和互作效应分析中找到最佳技术组合,只有根据求得的多项式回归方程,从本试验中共有的  $5 \times 5 \times 5 = 125$  个处理组合中,寻找体细胞胚发生数量大于 90 个/(g·callus) 的处理组合共有 7 个,体细胞胚发生实际数量最大的组合是 ABA 16mg/L、PEG4000 75g/L 和 AgNO<sub>3</sub> 10mg/L,体细胞胚发生数量为 105.126 个/(g·callus);本试验设计中,AgNO<sub>3</sub> 是在 0~10mg/L 范围内,表明最佳结果中 AgNO<sub>3</sub> 用量已经取值最高项,而由方程拟合最佳组合是:ABA 18.9138mg/L、PEG4000 为 88.8007g/L、AgNO<sub>3</sub> 10.7513mg/L,落叶松体细胞胚发生数量可达到 107.5278 个/(g·callus)。

## 3 讨 论

ABA 在针叶树的体细胞胚成熟过程中起着非常重要的作用(Roberts DR, 1991),实验表明,将体细胞胚转入无激素培养基使其最终萌发之前,用 ABA 处理可明显促进体细胞胚成熟(Dunstan DI, 1988);培养基中加入一定浓度的 ABA 可增强胚性愈伤组织的形成和体细胞胚的发生,ABA 可促进挪威云杉、北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)等体细胞胚的成熟;一般认为,ABA 的作用是防止裂生多胚现象(Cleavage polyembryony),促使胚胎单个化并进一步发育成熟,防止畸形胚的产生;早期通过将体细胞胚培养在含 ABA 的培养基上可使白云杉产生成熟胚,Attress SM 等(1989)发现,将白云杉未成熟胚置于 ABA(16~22μmol/L)和 PEG4000(7.5%)的组合中 4~8 周后,不但可抑制早熟萌发,而且成熟频率明显提高,成熟同步发生形成高质量的体细胞胚;PEG 是一种不能渗透细胞壁的高分子化合物(分子量约为 1000~8000),在合适的浓度下,可产生一种与干旱条件下相似的水分胁迫(Water stress),降低体细胞胚的含水量,促进体细胞胚成熟。

综上所述,ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 的组合,主要作用是调控体细胞胚的成熟,提高有效胚的比率,防止畸形胚与无效胚的发生;我们知道,胚性愈伤组织中体细胞胚的数量,在早期原胚与后期原胚阶段就已经形成并决定,ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 的组合,只是调控这些体细胞胚数量成熟的比率,提

高体细胞胚的质量,这也是本文研究的目的所在。Gupta(1987)与 Becwa(1990)以及黄健秋(1995)均报道过 ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 在针叶树体细胞胚发生中,需要这些因子的共同作用;本文研究发现,ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 的单因素效应与互作效应差异较大,如 AgNO<sub>3</sub> 的单因素效应相对较小,而与 ABA 或 PEG4000 共同作用时,体细胞胚发生数量差异极大;尤其是 PEG4000 的单因素效应很大,变异系数为 139.76%,表明这些因子的单因素效应与互作效应作用大小、作用机理不尽相同,且往往是几种因子不同浓度的共同作用影响着高质量体细胞胚的发生数量;所以如何以有限次的实验获得科学、合理的最佳结果,在针叶树体细胞胚发生研究中有其特殊的意义。

本实验进行了 ABA、PEG4000 和 AgNO<sub>3</sub> 对落叶松体细胞胚发生数量影响的研究,根据实验结果与设计,建立了各因子与体细胞胚发生数量总的多项式回归方程为:

$$\hat{y} = 7.0175 + 2.4348x_1 + 1.2310x_2 + 4.2465x_3 + 0.0010x_1x_2 + 0.0415x_1x_3 + 0.0432x_2x_3 - 0.0785x_1^2 - 0.0097x_2^2 - 0.4122x_3^2$$

本研究结果对提高落叶松体细胞胚发生潜力,合理使用激素浓度提供了最佳技术组合方案,在理论上和实际应用上都有重要的参考价值。我们应用了设计编码的 11 个试验处理组合中有代表性的 11 个数据,获得了  $5^3 = 125$  个处理的信息量,根据方程求得最佳处理组合是 ABA 18.9138mg/L、PEG4000 88.8007g/L 和 AgNO<sub>3</sub> 10.7513mg/L,在此条件下,最佳体细胞胚数量应为 107.5278 个/(g·callus)。

致 谢:山西农业大学农学院生物统计室陆强教授、杨锦忠博士在试验设计与分析中给予指导与帮助,在此表示诚挚的谢意!

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Ewald D, Kretzschmar U, Chen Y. Continuous micropropagation of juvenile larch from different species via adventitious bud formation. *Biologia Plantarum*, 1997, 39(3): 321~329
  - [2] Ewald D, Weckwerth W, Naujoks G et al. Formation of embryol-like structures in tissue culture of different yew species. *J Plant Physiol*, 1995, 147: 139~143
  - [3] Levee V, Lelu M A, Jouanin L et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch(*Larix kaempferi*)
- © 中国科学院微生物研究所期刊编辑部 plant regeneration, *Plant Cell*

Report, 1997, **16**: 680~685

- [ 4 ] GUAN X (关 雄), CHEN J Q (陈锦权), HUANG Z F (黄志鹏) *et al.* The media optimization and batch fermentation of *Bacillus Thuringiensis*, *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**(1): 75~80
- [ 5 ] CUI L (崔 林), FANG Y Y (范银燕). The culture of embryogenic calli and the establishment of suspension cell line of nalked oats, *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**(1): 46~50
- [ 6 ] XU Z R (徐中儒). The optimal regression design of agricultural test, Harbin the heilongjiang agriculture science and technology publishing company (黑龙江农业科学技术出版社), 1988
- [ 7 ] FANG K T (方开泰), WANG Y (王 元). The equality design and equality design statistical tables Beijing Science Press (科学出版社), 1994, pp. 12~15
- [ 8 ] Xin Y Li, Feng H Huang, J Brad Murohy *et al.* Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L. ), *In vitro Cell. Dev Biol-Plant*, 1998, **34**: 22~26
- [ 9 ] Gupta, P K, Durzan D J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine, *Biotechnology*, 1987, **5**: 147~151
- [ 10 ] Becwar M R., Nagmani R, Wann S R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine, *Can J For Res*, 1990, **20**: 810~817
- [ 11 ] HUANG J Q (黄健秋), WEI Z M (卫志明), XU Z H (许智宏). The Somatic Embryogenesis and Regeneration from mature Zygotic Embryos of *Pinus masson*, *Science Bulletin* (科学通报), 1995, **40**(1): 72~75
- [ 12 ] Roberts D R. Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol Plant*. 1991, **83**: 247~254
- [ 13 ] Dunstan D I, Bekkaoul F, Pllon M *et al.* Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) Somatic Embryos, *Plant Sci*, 1988, **53**: 77
- [ 14 ] Attrech S M, Dunstan D I, Fowke L C. Plantlet regeneration from embryogenic protoplasts of white Spruce (*Picea glauca*), *Bio/Technology*, 1989, **7**: 1060~1068

## Study on Effect of ABA, PEG4000 and AgNO<sub>3</sub> on Number of Somatic Embryos of *Larix Principis-rupprechtii* by 311-A Regression Design

QI Li-Wang\* HAN Yi-Fan LI Ling

(Molecular Genetic Department, Research Institute of Forestry Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Dietrich Ewald

(Federal Research Centre for Forestry, Institute for Forestry Tree Breeding and Biotechnology, Eberswalder Chaussee 6, 15377 Waldsiedersdorf, Germany)

HAN Su-Ying

(Research Centre of Forestry Biotechnology, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030801, China)

**Abstract** This paper, the effects of ABA, PEG4000 and AgNO<sub>3</sub> on the number of somatic embryos of *Larix Principis-Rupprechtii* were carried out by 311-A regression design. The regression equation was established which expresses the number of somatic embryos of *Larix Principis-Rupprechtii* as function, and the ABA, PEG4000 and AgNO<sub>3</sub> as variable respectively. Using the regression equation, the single factor effect and mutual effect between the number of somatic embryos of *Larix Principis-Rupprechtii* and ABA, PEG4000 and AgNO<sub>3</sub> was studied; the optimum concentration recipes can be obtained by computer processing, that are ABA: 18.9138mg/L, PEG4000: 88.8007g/L and AgNO<sub>3</sub>: 10.7513mg/L, the target somatic embryos number is 107.5278 each gram callus. The results of experiment showed that this method is simple, practical and rapid for selecting several hormone category and concentration recipes media of conifer somatic embryogenesis.

**Key words** *Larix Principis-Rupprechtii*, 311-A regression design, number of somatic embryos, single factor effect, mutual effect

Received: March 6, 2000

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China (39870632) and the National "948" program of Chinese Ministry of Forestry (98-4-04-02).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62889641; Fax 86-10-62872105 © 中国林业出版社 联合编辑部 http://journals.im.ac.cn