

文章编号: 1001-1498(2001)03-0251-07

# 落叶松胚性愈伤组织诱导培养基中激素的 311-A 最优回归设计筛选\*

齐力旺<sup>1</sup>, 李玲<sup>1</sup>, 韩一凡<sup>1</sup>, 韩素英<sup>2</sup>, Dietrich Ewald<sup>3</sup>

(1. 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100091; 2. 山西农业大学 林木生物技术研究中心,  
山西 太谷 030801; 3. Federal Research Centre for Forestry, Institute for Forestry Tree Breeding  
and Biotechnology, Eberswalder Chaussee 6, 15377 Waldsiedersdorf, Germany)

**摘要:** 采用 311-A 最优回归设计, 对落叶松胚性细胞诱导中激素种类与浓度优化筛选, 建立胚性愈伤组织量依 2, 4-D、BA、KT 的多项式回归方程。分析了试验因子的主效应和交互效应, 借助此方程获得了 3 因子的最佳配比组合以及最佳胚性愈伤组织发生量。2, 4-D 为  $1.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、BA 为  $0.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 KT 为  $0.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 落叶松胚性愈伤组织的诱导量可达到  $13.9317 \text{ mg} \cdot \text{个}^{-1}$  (外植体)。结果表明, 这是一种简便、实用、科学的优化培养基的途径。

**关键词:** 落叶松; 胚性愈伤组织; 311-A 最优回归设计; 主效应; 交互效应

**中图分类号:** S718.43 **文献标识码:** A

在植物体细胞胚胎发生研究中, 在多个因素、多个水平同时参选的情况下, 寻求一种组合少、工作量小, 而又能够获得大信息量和最佳结果的设计方法, 在生物技术研究方面有其特殊的意义。我国在 70 年代已把正交设计应用于植物组织培养研究中, 此后, 正交设计成为植物组织培养研究的主要设计方法; 孙洪涛等<sup>[1]</sup>用多因子的方差分析, 洪树荣等<sup>[2]</sup>用正交拉丁方实验来筛选培养基, 均获得了较理想的效果。但是, 若参选的因素、水平数较多时, 正交设计及其它较流行的方法往往要求做较多的试验, 方开泰<sup>[3]</sup>为了解决多因素、多水平问题而提出了均匀设计, 徐华松等运用于万利包心菜 (*B. rassaica oleracea* var. *capitata* L.) 的器官发生培养基设计中。然而, 上述设计方法的不足之处是被分析的因子及组合是有限的, 因子梯度是间断的、不连续的。本试验中用的 311-A 最优回归设计, 通过较少的试验, 获得很多的信息量, 并根据实验结果, 得到设计试验结果的曲线图, 从而使因子梯度变为连续的、不间断的, 利用 SAS 程序, 可获得原设计组合处理以外的浓度梯度和组合, 应用于现代生物技术领域, 使研究结果更加科学、合理、可行。

收稿日期: 2000-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870632, 39770629)和国家林业局“948”项目(98-4-04-02)资助

作者简介: 齐力旺(1962-), 男, 山西文水人, 副研究员, 博士

\* 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, 特此致谢

# 1 材料与方法

## 1.1 供试材料

华北落叶松(*Larix principis-rupprechtii* Mayr.) 采自山西省关帝林区庞泉沟自然保护区30年生天然母树林,海拔1680m, 37°52'N, 111°56'E, 依林木选择育种方法,选取5株优良单株(即5个基因型),于1998年6月10、20、25日和7月6、15日依次定株,分批、单独采集未成熟球果。用70%酒精消毒1min,0.1%升汞溶液消毒6min后,无菌水冲洗5次,在超净台上剥取种胚接种,每皿接种25个,置于23~26℃下暗培养。

## 1.2 培养基及培养条件

基本培养基用S培养基<sup>[4,5]</sup>,附加激素范围为2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)0~2.20mg·L<sup>-1</sup>,BA(6-苄氨基嘌呤)0~0.80mg·L<sup>-1</sup>,KT(激动素)0~0.80mg·L<sup>-1</sup>(表2),蔗糖3%,Sigma公司琼脂粉0.3%,pH5.8,温度23~25℃,黑暗条件下培养。

## 1.3 胚性愈伤组织量的确定

外植体在诱导培养基上培养7d后,外植体膨大,颜色变化明显,10~15d即有愈伤组织产生。确定胚性愈伤组织后,分别于接种后的第36d,定盘、定外植体转接,每挑取一个外植体的胚性愈伤组织,在超净台的天平上随即称其质量,并随时记载、编号。

## 1.4 试验设计

以试验因子2,4-D、BA与KT的质量浓度为自变量,以每个落叶松外植体诱导获得的胚性愈伤组织量为函数,根据311-A最优回归设计要求,以试验因子(自变量)编码值相应的质量浓度拟订试验处理组合;并对试验因子(自变量)的设计水平进行线性编码代换(表1),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。

表1 试验因子编码设计方案

试验因子	编码间距	试验因子编码设计						
		-2	-1.414	-1	0	1	1.414	2
2,4-D(x <sub>1</sub> )/(mg·L <sup>-1</sup> )	0.55	0	0.32		1.10		1.88	0.20
BA(x <sub>2</sub> )/(mg·L <sup>-1</sup> )	0.20	0	0.12		0.40		0.68	0.80
KT(x <sub>3</sub> )/(mg·L <sup>-1</sup> )	0.20			0.20	0.40	0.60		0.80

根据实验结果建立落叶松胚性愈伤组织量与2,4-D、BA、KT多项式回归方程:

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

其中,  $b_0$  为常数项,  $b_j$  为一次项回归系数,  $b_{ij}$  为互作项回归系数,  $b_{jj}$  为二次项回归系数。

# 2 结果与分析

## 2.1 研究数据的筛选与确定

华北落叶松外植体仅有某一时期内采集的未成熟球果,才易诱导胚性愈伤组织。统计发现,本研究用的2<sup>#</sup>基因型大量发生胚性愈伤组织是6月26日~6月30日采集的球果,6月25日前与7月5日后采集的球果只有极少数能诱导出胚性细胞,该期以外采集的球果几乎未见胚性愈伤组织的发生;而3<sup>#</sup>基因型大量产生胚性愈伤组织是6月20日采集的球果,其余很少

见胚性愈伤组织发生; 这个结果与 Tulecke<sup>[6]</sup>在白云杉 [*Picea glauca* (Moench) Voss]、黑云杉 (*P. mariana* B. S. P.)、糖松 (*Pinus lambertiana* Dougl.)、火炬松 (*P. taeda* Linn.)、美国五针松 (*P. strobes* Linn.) 与北美黄杉 [*Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco] 的体胚诱导中报道的仅有某一时间内采集的球果, 才能建立良好的体胚发生体系结论一致。这就是说, 只有在合适的球果发育时期, 在合适的含有 2, 4-D、BA 与 KT 的培养基上, 才能诱导胚性愈伤组织。但是, 如果外植体不在诱导胚性愈伤组织时期, 那么在含 2, 4-D、BA 与 KT 组合的培养基上也不能发生胚性愈伤组织。由于不同组合的 2, 4-D、BA 与 KT 对诱导胚性愈伤组织作用大小不同, 存在着很大差异, 所以取各组合中诱导胚性愈伤组织临界值之上的数据进行统计分析。本研究数据取自 6 月 20 日采集的 3<sup>#</sup> 基因型的未成熟球果外植体, 在设计的 11 种培养基上均能诱导胚性愈伤组织发生, 在每一组合中的定个体取 3 个外植体产生的胚性愈伤组织的平均数, 以便正确研究 2, 4-D、BA 与 KT 对诱导落叶松胚性愈伤组织的影响。

### 2.2 落叶松胚性愈伤组织的诱导与 2, 4-D、BA、KT 用量的关系

2.2.1 回归方程的建立 试验用 311-A 最优回归设计, 2, 4-D ( $x_1$ )、BA ( $x_2$ )、KT ( $x_3$ ) 与胚性愈伤组织的实验结果见表 2。

表 2 试验因子实施方案与每个外植体诱导胚性愈伤组织诱导结果

处理号	编码(含量/(mg · L <sup>-1</sup> ))			实际胚性愈伤质量/ (mg · 个 <sup>-1</sup> )	理论胚性愈伤质量/ (mg · 个 <sup>-1</sup> )
	2, 4-D ( $x_1$ )	BA ( $x_2$ )	KT ( $x_3$ )		
1	0(1.10)	0(0.40)	2(0.80)	12.50	12.91
2	0(1.10)	0(0.40)	- 2(0)	8.46	8.05
3	- 1.414(0.32)	- 1.414(0.12)	1(0.60)	10.00	9.79
4	1.414(1.88)	- 1.414(0.12)	1(0.60)	12.50	12.29
5	- 1.414(0.32)	1.414(0.68)	1(0.60)	11.18	10.97
6	1.414(1.88)	1.414(0.68)	1(0.60)	11.43	11.22
7	2(2.20)	0(0.40)	- 1(0.20)	8.82	9.03
8	- 2(0)	0(0.40)	- 1(0.20)	8.18	8.39
9	0(1.10)	2(0.80)	- 1(0.20)	10.00	10.20
10	0(1.10)	- 2(0)	- 1(0.20)	6.67	6.87
11	0(1.10)	0(0.40)	0(0.40)	13.33	13.33

根据实验结果和 311-A 最优回归设计, 建立了 2, 4-D、BA、KT 各因子与落叶松诱导胚性愈伤组织量 [mg · 个<sup>-1</sup>(外植体)] 的多项式回归方程:

$$y = - 1.1246 + 5.9344x_1 + 23.3774x_2 + 22.7825x_3 - 2.5755x_1x_2 + 1.4763x_1x_3 - 10.1607x_2x_3 - 2.2311x_1^2 - 17.9371x_2^2 - 17.8356x_3^2 \quad (2)$$

其中, 方程的决定系数为  $R^2 = 0.9849$ , 表明方程的拟合效果非常好。

2.2.2 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, 只要把其它两个技术因子以零水平处理编码代入, 可得到本试验中 2, 4-D ( $x_1$ ) 与胚性愈伤质量  $y_1$ , BA ( $x_2$ ) 与胚性愈伤质量  $y_2$ , KT ( $x_3$ ) 与胚性愈伤组织量  $y_3$  的 3 个一元二次数学方程:

$$y_1 = - 1.1246 + 5.9344x_1 - 2.2311x_1^2 \quad (3)$$

$$y_2 = - 1.1246 + 23.3774x_2 - 17.9371x_2^2 \quad (4)$$

$$y_3 = -1.1246 + 22.7825x_3 - 17.8356x_3^2 \quad (5)$$

由回归方程求得 2, 4-D ( $x_1$ )、BA ( $x_2$ )、KT ( $x_3$ ) 7 个处理水平的落叶松胚性愈伤组织量 (表 3)。

表 3 各试验因子不同处理的胚性愈伤组织量

试验因子	因子 编 码							变异 系数 CV/%	最高胚性愈伤组织量	
	- 2	- 1.414	- 1	0	1	1.414	2		因子用量/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	胚性愈伤量/ ( $\text{mg} \cdot \text{个}^{-1}$ )
2, 4-D/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	- 1.124 6	0.545 9	2.069 4	2.703 6	2.593 0	2.146 5	1.132 6	95.40	1.33	2 821.6
BA/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	- 1.124 6	1.422 4	2.833 4	5.356 4	6.444 4	6.477 9	6.097 6	75.34	0.65	6 492.3
KT/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	- 1.124 6	1.352 5	2.718 5	5.134 7	6.124 1	6.120 3	5.686 6	75.71	0.64	6 150.8

由表 3 的变异系数表明, 2, 4-D、BA 对落叶松未成熟胚诱导胚性愈伤组织都有重要的影响, 而 KT 的作用相对较小, 这说明在诱导落叶松胚性愈伤组织的培养基中, 除主要的 2, 4-D 外, 适当注意调节 BA 质量浓度是非常必要的。

从各试验因子的一元二次方程中, 由  $x_i = b_i / -2b_{ii}$  求得各试验因子在诱导胚性愈伤组织最高时编码值和相应的实际用量 (表 3)。结果可知, 诱导落叶松胚性愈伤组织量最高时, 2, 4-D、BA、KT 质量浓度分别为 1.33、0.65 和 0.64  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。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优选各因子的最佳用量显然是不全面的。有必要对试验因子间一级互作进行剖析。

## 2.3 试验因子间互作效应

### 2.3.1 2, 4-D 与 BA 的互作效应

$$y = -1.1246 + 5.9344x_1 + 23.3774x_2 - 2.5755x_1x_2 - 2.2311x_1^2 - 17.9371x_2^2 \quad (6)$$

由方程 (6) 可得 5 种 2, 4-D 质量浓度和 5 种 BA 质量浓度条件下, 落叶松胚性愈伤组织诱导的实验结果 (表 4)。

表 4 2, 4-D ( $x_1$ )、BA ( $x_2$ ) 与胚性愈伤组织量的关系

2, 4-D/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	BA/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$					CV/%
	0	0.12	0.40	0.68	0.80	
0	- 1.124 6	1.422 4	5.356 4	6.477 9	6.097 6	91.65
0.32	0.545 9	2.994 0	6.697 3	7.588 0	7.108 8	61.72
1.10	2.703 6	4.910 6	8.051 4	8.379 7	7.659 3	38.71
1.88	2.146 5	4.112 4	6.690 7	6.456 5	5.495 1	37.77
2.20	1.132 6	2.999 6	5.347 1	4.882 1	3.821 9	45.99
CV/%	138.18	40.13	17.55	19.59	24.83	54.29

由表 4 可知, 当 2, 4-D 质量浓度为 0~1.10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , BA 质量浓度为 0~0.68  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 诱导落叶松胚性愈伤组织量随 2, 4-D 和 BA 质量浓度的增加而增加; 2, 4-D 质量浓度为 1.10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , BA 质量浓度为 0.68  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 诱导胚性愈伤组织量从 0 增到 8 379.7  $\text{mg} \cdot \text{个}^{-1}$  (外植体); 若不加 BA, 单加 2, 4-D 质量浓度为 1.10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 胚性愈伤组织量仅为 2 703.6  $\text{mg} \cdot \text{个}^{-1}$  (外植体)。可见, 只有当 2, 4-D 与 BA 合理配合时, 才能获得最佳实验结果。同时, 高浓度的 2, 4-D (大于 1.88  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和高浓度的 BA (大于 0.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 也会明显对诱导胚性愈伤组织不利。

2.3.2 2,4-D ( $x_1$ ) 与 KT ( $x_3$ ) 的互作效应 2,4-D ( $x_1$ ) 与 KT ( $x_3$ ) 对诱导胚性愈伤组织量的作用可从下面回归方程(7)中剖析:

$$y = -1.1246 + 5.9344x_1 + 22.7825x_3 + 1.4763x_1x_3 - 2.2311x_1^2 - 17.8356x_3^2 \quad (7)$$

KT 对落叶松胚性愈伤组织的影响比 2,4-D 与 BA (表 5)、2,4-D 与 KT 对落叶松胚性愈伤组织的共同作用的基本规律有别于 2,4-D 与 BA。当 KT 质量浓度为 0~0.40 mg·L<sup>-1</sup> 时, 随着 2,4-D 质量浓度由 0 增至 1.10 mg·L<sup>-1</sup> 时, 落叶松胚性愈伤组织量逐渐增加; 而 KT 为 0.40~0.80 mg·L<sup>-1</sup> 范围内, 2,4-D 质量浓度为 1.65 mg·L<sup>-1</sup> 时, 落叶松胚性愈伤组织量最高; 2,4-D 质量浓度为 0~1.10 mg·L<sup>-1</sup> 时 KT 为 0~0.60 mg·L<sup>-1</sup>, 胚性愈伤组织量处于上升趋势, 而 2,4-D 为 1.88~2.20 mg·L<sup>-1</sup>, KT 质量浓度达到 0.68 mg·L<sup>-1</sup> 时, 落叶松胚性愈伤组织量还处于上升趋势, 说明 2,4-D 与 KT 之间存在较大的正互作。2,4-D 为 1.88 mg·L<sup>-1</sup>, KT 为 0.80 mg·L<sup>-1</sup> 时, 每个外植体胚性愈伤组织量可达到 11.1780 mg; 平均每增加 1 mg·L<sup>-1</sup>, 每个外植体就可增加胚性愈伤组织 13.9725 mg; 每增加 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, 可增加胚性愈伤组织 5.9457 mg·个<sup>-1</sup> (外植体), 表明 2,4-D 与 KT 之间互作效应显著; 如果 2,4-D 大于 1.65 mg·L<sup>-1</sup> 时, 胚性愈伤组织量反而下降(表 5)。可见, 2,4-D 与 KT 只有合理配合施用才能获得最佳结果。

表 5 2,4-D ( $x_1$ )、KT ( $x_3$ ) 与落叶松胚性愈伤组织量的关系

mg·个<sup>-1</sup>

2,4-D/(mg·L <sup>-1</sup> )	KT/(mg·L <sup>-1</sup> )							CV/%
	0	0.12	0.20	0.40	0.60	0.68	0.80	
0	-1.1246	1.3525	2.7185	5.1347	6.1241	6.1203	5.6866	75.71
0.32	0.5459	3.0797	4.4835	6.9942	8.0781	8.1120	7.7351	52.85
0.55	2.0694	4.0389	5.7699	8.0485	9.2003	9.2614	8.9252	42.26
1.10	2.7036	5.3756	6.8715	9.6125	10.9267	11.0528	10.8140	39.97
1.65	2.5930	5.6534	7.2143	10.1167	11.5942	11.7853	11.6439	41.47
1.88	2.1465	4.9567	6.5446	9.5160	11.0604	11.2787	11.1780	44.55
2.20	1.1326	3.9994	5.6252	8.6910	10.3300	10.5860	10.5421	51.50
CV/%	95.4	36.72	27.93	21.12	20.34	20.94	22.82	50.42

2.3.3 BA 与 KT 的互作效应 BA ( $x_2$ ) 与 KT ( $x_3$ ) 对落叶松胚性愈伤组织量(表 6)的作用可从下面多项式回归方程(8)中获悉。

$$y = -1.1246 + 23.3774x_2 + 22.7825x_3 - 10.1607x_2x_3 - 17.9371x_2^2 - 17.8356x_3^2 \quad (8)$$

表 6 BA ( $x_2$ ) 与 KT ( $x_3$ ) 对胚性愈伤组织诱导的作用

mg·个<sup>-1</sup>

BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	KT/(mg·L <sup>-1</sup> )							CV/%
	0	0.12	0.20	0.40	0.60	0.68	0.80	
0	-1.1246	1.3525	2.7185	5.1347	6.1241	6.1203	5.6866	75.71
0.12	1.4224	3.7532	5.0216	7.1940	7.9395	7.8382	7.2582	42.86
0.20	2.8334	5.0666	6.2701	8.2798	8.8628	8.6964	8.0189	32.87
0.40	5.3564	7.0207	8.3866	9.9900	10.1665	9.8377	8.9162	20.90
0.60	6.4444	8.1899	9.0682	10.2651	10.0352	9.5437	8.3785	14.87
0.68	6.4779	8.1259	8.9391	9.9735	9.5810	9.0245	7.7617	22.73
0.80	6.0976	7.5993	8.3149	9.1055	8.4691	7.8151	6.4059	14.26
CV/%	75.34	44.14	34.43	21.81	16.18	15.12	15.09	35.35

由表6和方程(8)结果显示,BA为 $0\sim 0.80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,KT由0增加至 $0.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,胚性愈伤组织均处于升高趋势;KT为 $0\sim 0.80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,BA从0到 $0.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,也处于胚性愈伤组织上升趋势,但KT为0时BA的上升趋势可达到 $0.68\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而KT为 $0.80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时BA的上升趋势只有 $0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。可能BA与KT之间存在着一定的负互作,说明低浓度的BA与KT或高浓度的BA与KT都不利于落叶松胚性愈伤组织的诱导,而且会引起胚性愈伤组织量的下降。只有配合BA和KT用量才能获得最佳效应。表6可知,BA与KT之间合理配制的浓度为BA $0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KT $0.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,此时,可能获得最佳胚性愈伤组织量。

## 2.4 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,借助计算机从本试验中共有 $5^3=125$ 个处理组合中寻找诱导落叶松胚性愈伤组织量的最佳处理组合。125个处理组合中,每个外植体胚性愈伤组织量大于 $11\text{ mg}$ 的处理组合共27个,实际最佳组合是2,4-D $1.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、BA $0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KT $0.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,实际最佳胚性愈伤组织量为 $13.8359\text{ mg}\cdot\text{个}^{-1}$ (外植体),而由方程中拟合的最佳组合方案是2,4-D $1.29\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、BA $0.39\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KT $0.58\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,落叶松胚性愈伤组织诱导量可达到 $13.9317\text{ mg}\cdot\text{个}^{-1}$ (外植体)。

## 3 讨论

在细胞的胚性化过程中,激素调控了植物细胞分化、生长方向与进程等整个生命过程,体细胞胚性化的一个重要前提是这些细胞必须脱离整体约束而进行离体培养,细胞在离体培养条件下缺乏合成生长素和细胞分裂素的能力,所以,在培养基中添加不同种类和浓度的外源激素诱导胚性愈伤组织成为关键问题,但是这些外源激素的作用大小、作用机理不尽相同,且往往是几种激素浓度的相互作用,共同影响着实验结果。2,4-D、BA和KT是落叶松胚性愈伤组织发生的主导因子,它们的用量大小、处理组合效应以及各因子间的相互影响是许多生物技术研究者们关注的热点,因此,以有限次的实验获得科学、合理的最佳结果,是非常重要的。

运用311-A最优回归设计编码的11个试验组合处理的有代表性的11个数据,建立的2,4-D、BA、KT各因子与落叶松诱导胚性愈伤组织量的多项式回归方程为:

$$y = -1.1246 + 5.9344x_1 + 23.3774x_2 + 22.7825x_3 - 2.5755x_1x_2 + 1.4763x_1x_3 - 10.1607x_2x_3 - 2.2311x_1^2 - 17.9371x_2^2 - 17.8356x_3^2$$

该方程的拟合效果非常好( $R^2=0.9849$ )。从而获得了 $5^3=125$ 个处理组合的信息量。探讨2,4-D、BA与KT对落叶松胚性愈伤组织影响的大小、互作效应大小与方向的关系,为提高落叶松胚性愈伤组织发生潜力、合理使用激素浓度提供了最佳技术组合方案,具有重要的理论和实际参考价值。但应注意,本研究方法中11个数据的获得一定要科学、合理、准确,并且有代表性;依据方程拟合的最佳组合方案是2,4-D $1.29\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、BA $0.39\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KT $0.58\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,落叶松胚性愈伤组织的诱导量可达到 $13.9317\text{ mg}\cdot\text{个}^{-1}$ 外植体。求得的最佳组合在125个处理组合之外,既减少了工作量,又大大提高了工作效率及实验的科学性和合理性。

## 参考文献

- [1] 孙洪涛, 曲家祥, 傅卫东. 应用多因子试验的方差分析筛选亚麻花药培养基[J]. 植物学通报, 1988, 5(3): 176~ 181.
- [2] 洪树荣, 钟杨, 傅俊. 正交拉丁方实验在猕猴桃组织培养中的应用[J]. 武汉植物学研究, 1990, 8(2): 171~ 177.
- [3] 方开泰, 王元. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 12~ 15.
- [4] Ewald D, Kretzschmar U, Chen Y. Continuous micropropagation of juvenile larch from different species via adventitious bud formation[J]. *Biologia Plantarum*, 1997, 39(3): 321~ 329.
- [5] Ewald D, Weckwerth W, Naujoks G, et al. Formation of embryo-like structures in tissue culture of different new species [J]. *J Plant Physiol*, 1995, 147: 139~ 143.
- [6] Tulecke W. Somatic embryogenesis in woody perennials [A]. In: Bonga J M, Durzan D J. *Cell and Tissue Culture in Forestry. Specific Principles and Method: Growth and Development* [M]. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, Boston, Lancaster. 1987, Vol 2: 61~ 91.
- [7] 关雄, 陈锦权, 黄志鹏, 等. 苏云金芽孢杆菌培养基优化及间歇发酵[J]. 生物工程学报, 1998, 14(1): 75~ 90.
- [8] 崔林, 范银燕. 裸燕麦胚性愈伤组织培养及悬浮系的建立[J]. 生物工程学报, 1998, 14(1): 46~ 50.
- [9] 徐中儒. 农业试验最优回归设计[M]. 哈尔滨: 黑龙江农业科学技术出版社, 1988.
- [10] Rajasekaran K, Hein M B, Vasil I K. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *pennisetum purpureum* schum-effects *in vivo* and *in vitro* of glyphosate, fluridone, and paclobutrazol [J]. *Plant Physiol*, 1987, 84: 47~ 51.
- [11] Kamada H, Harada H. Changes in the endogenous level and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. [J]. *Plant & Cell Physiol*, 1981, 22: 1423~ 1429.
- [12] Kamada H, Harada H. Changes in endogenous amino acid compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. [J]. *Plant & Cell Physiol*, 1984, 25: 27~ 38.
- [13] Levee V, Lelu M A, Jouanin L, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* × *L. decidua*) and transgenic plant regeneration [J]. *Plant Cell Report*, 1997, 16: 680~ 685.

## Study on Induction Embryogenic Callus of *Larix principis-rupprechtii* by 311-A Regression Design

QIL Wang<sup>1</sup>, LILing<sup>1</sup>, HAN Yifan<sup>1</sup>, HAN Suying<sup>2</sup>, Dietrich Ewald<sup>3</sup>

(1. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China; 2. Research Centre of Forestry Biotechnology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; 3. Federal Research Centre for Forestry,

Institute for Forestry Tree Breeding and Biotechnology, Eberswalder Chaussee 6, 15377 Waldsiedersdorf, Germany)

**Abstract:** The effects of 2, 4-D, BA and KT on induction embryogenic callus (EC) of *L. principis-rupprechtii* were carried out by 311-A regression design. The regression equation was established which expresses the height of induction EC of *L. principis-rupprechtii* as function, and the 2, 4-D, BA and KT as variable respectively. Using the regression equation, the single factor effect and mutual effect between the height of induction EC of *L. principis-rupprechtii* and 2, 4-D, BA and KT was studied; the optimum concentration recipes can be obtained by computer processing, that are 2, 4-D:  $1.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , BA:  $0.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and KT:  $0.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the target height of induction EC is  $13.9317 \text{ mg}$  per explant. 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*; weight of induction embryogenic; 311-A regression design; callus (EC); single factor effect; mutual effect