

不同前体对黄芪悬浮培养细胞中黄芪多糖积累的影响

杨静 (天津渤海职业技术学院, 天津 300402)

摘要 [目的]研究苯丙氨酸、草酸和油酸等前体对黄芪细胞生长和黄芪多糖合成的影响。[方法]在细胞培养的第0天,向细胞悬浮培养液中加入3种前体,测定细胞干重增殖倍数和黄芪多糖的含量。[结果]添加2 mmol/L的草酸可以明显地促进黄芪细胞中黄芪多糖的积累,其含量为对照组的1.80倍;较低浓度苯丙氨酸能有效促进黄芪细胞中黄芪多糖的合成;当苯丙氨酸浓度为1.0 mmol/L,黄芪多糖的含量达最大,为33.429 mg/g,为对照组的1.70倍;当油酸添加浓度由0.1 mmol/L增加至2 mmol/L时,细胞中黄芪多糖的含量逐渐提高;2 mmol/L的油酸使黄芪多糖的含量达37.565 mg/g,为对照组的1.91倍。[结论]前体的添加可有效促进黄芪悬浮培养细胞中黄芪多糖的积累。

关键词 前体;黄芪多糖;积累;细胞悬浮培养;黄芪

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)27-09317-03

Effect of Different Precursors on Accumulation of Astragalus Polysaccharides in the Suspension Culture Cell of *Astragalus membranaceus*

YANG Jing (Tianjin Bohai Vocational and Technical College, Tianjin 300402)

Abstract [Objective] To investigate the effects of different precursors (oxalic acid, phenylalanine, oleic acid) on the cell growth and the formation of astragalus polysaccharides in *Astragalus membranaceus* cells. [Method] The three kinds of precursors were added to the suspension culture cell on the day 0. Then the cell growth rate and the astragalus polysaccharides content in *Astragalus membranaceus* cells were determined. [Result] The addition of 2 mmol/L oxalic acid could significantly increase the accumulation of astragalus polysaccharides by about 1.80 times than the control. The low concentration of phenylalanine can effectively stimulate the synthesis of astragalus polysaccharides. The content of astragalus polysaccharides reached 33.429 mg/g by adding 1.0 mmol/L phenylalanine, and it was 1.70 times as that of control. With the addition of 2 mmol/L oleic acid, astragalus polysaccharides content reached to 37.565 mg/g by 1.91 times than the control. [Conclusion] The addition of the precursors was effective to promote the formation of astragalus polysaccharides in *Astragalus membranaceus* cells.

Key words Precursors; Astragalus polysaccharides; Accumulation; Suspension culture cell; *Astragalus membranaceus*

黄芪又名北芪、元芪或黄耆,豆科多年生草本植物,根为重要的中药材。目前我国可供药用的黄芪品种很多,但主要以膜荚黄芪和蒙古黄芪为主。传统中医学认为,黄芪具有补气固表、利尿排毒、敛疮生肌、补中益气等功效^[1]。现代药理研究表明,黄芪具有增强机体免疫功能、强心降压、降血糖、利尿、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、抗病毒、镇静、镇痛等作用^[2]。由于黄芪药性温和,素有补气固表之“圣药”的美誉。以黄芪为原料生产的中成药多达200余种,著名的“补中益气汤”就是由黄芪配伍而成。黄芪中含有多糖、皂苷、黄酮、氨基酸和微量元素等多种有效成分,其中黄芪多糖(Astragalus Polysaccharin, APS)是黄芪的主要活性成分之一,具有增强机体抵抗力、促进免疫、促进抗体合成、双向调节血糖和保护心血管系统等作用,可作为免疫促进剂或调节剂,广泛应用于中医临床^[3]。

目前,随着保健药的日益畅销,黄芪的需求量持续增加,市场大量需求导致野生资源的过度采挖,野生黄芪濒临灭绝。商品中药材的黄芪主要来源于人工栽培,但受季节变换和病虫害的影响,品质和产量均有所下降。采用植物组织培养技术生产植物的有效成分,是解决药材资源问题有效途径之一,也是对药材生产的根本性改革。黄芪组织培养方面的报道多集中在黄芪愈伤组织培养和分化及不定根培养方面的研究^[4-5],对黄芪细胞悬浮培养的研究很少,且利用不同前体添加的手段提高黄芪细胞中黄芪多糖合成的研究还未

有报道。该试验考察了苯丙氨酸、油酸和草酸等3种前体对黄芪细胞生长和黄芪多糖合成的影响,以期黄芪细胞大规模培养生产黄芪多糖提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 黄芪种子(北京时珍中草药研究所),经乐仁堂制药厂中心化验室鉴定为 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge. 的种子。黄芪多糖对照品、葡萄糖对照品购自中国药品生物制品检定所。苯丙氨酸、油酸和草酸等试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器 202型电热恒温干燥箱;TCYQ ZYSA0351型超大型摇床;BCN-1360型净化工作台;Sartorius BS 2202S型电子天平;UV-7500紫外分光光度计;HPG-280B强光照培养箱等。

1.3 方法

1.3.1 黄芪无菌苗的获得。选择饱满的黄芪种子于70%的乙醇中浸泡1 min,用无菌水冲洗2次,然后用2%次氯酸钠溶液进行表面消毒30 min后,用无菌水浸洗5次。将已灭菌的种子接入培养基,培养条件为MS+3%蔗糖+琼脂1%、pH5.8、光照16 h培养,4~5 d后种子萌发,20 d后试管苗长势良好。

1.3.2 愈伤组织的诱导和继代培养。取黄芪无菌苗的幼嫩叶片,自来水冲洗干净,75%酒精消毒30 s,0.1% HgCl₂ 消毒7 min,然后无菌水冲洗4次,无菌滤纸吸干水分,切成0.5 cm²的小块,接种到诱导培养基上培养,培养条件为MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA+3%蔗糖+1%琼脂,pH5.8、黑暗培养、(24±1)°C,挑选生长良好的愈伤组织,

称重后继代培养,每四周继代一次,继代培养基中添加 2.0 mg/L 6-BA,其他同诱导培养基,培养条件同前。以上培养基接种前须经高压灭菌,灭菌温度 121 °C,灭菌时间 20 min。

1.3.3 黄芪细胞株的获得。将愈伤组织(约 2 g 鲜重)转移到含 50 ml 液体的培养基(MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA + 3% 蔗糖, pH5.8)的 250 ml 锥形瓶中悬浮培养,每 15 d 继代一次,在继代培养过程中,将大块尚未分散的愈伤组织去除,同时去除褐化的愈伤组织,悬浮培养时,摇床的转速为 120 r/min, (22 ± 1) °C, 暗培养。

1.3.4 前体饲喂试验。油酸用无水乙醇溶解,配成试验用浓度的溶液。苯丙氨酸、草酸和油酸使用前均用微孔滤膜(0.45 μm)进行过过滤除菌。在培养的第 0 天向培养基中分别加入 0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的 3 种前体。培养基 pH5.8, 摇床转速 120 r/min, 每组重复 3~4 瓶, 以未添加前体的组分作为对照。培养第 18 天收获黄芪细胞。

1.3.5 生物量的测定。将悬浮细胞液置于离心管中, 转速 8 000 r/min, 离心 15 min, 弃去上清液, 用蒸馏水洗涤细胞 2~3 次, 弃去上清液, 称得沉淀细胞质量, 即为细胞鲜重, 置于烘箱中 60 °C 干燥 7~8 h 以至恒重, 称其质量为细胞干重。干重增值倍数 = (收获时细胞干重 - 接种时细胞干重) / 接种时细胞干重。

1.3.6 黄芪多糖的含量测定。

1.3.6.1 样品溶液的制备^[6]。取黄芪细胞培养物 50 °C 下烘干至恒重, 粉碎, 准确称取 1.500 g, 用滤纸包好置索氏提取器中加入 70% 的乙醇提取 3 h, 挥干滤纸包中的乙醇, 放入小烧杯中加入 20 倍量的去离子水超声, 提取 110 min。水提液浓缩定容于 25 ml 的容量瓶中备用。

1.3.6.2 对照品溶液的制备。精密称取于 105 °C 干燥至恒重的 D-无水葡萄糖 100 mg, 置 100 ml 量瓶中加水溶解, 定

容至刻度, 摇匀即得 1 μg/ml 的对照品溶液。

1.3.6.3 黄芪多糖含量测定方法。精密吸取空白对照品和供试品溶液各 2 ml 于具塞试管中, 分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 ml, 摇匀, 迅速加入 5.0 ml 浓硫酸, 振摇 2 min, 置沸水浴中加热 15 min, 取出置冷水浴中冷却 30 min, 以蒸馏水为空白对照, 在 490 nm 处测定吸光度。根据回归方程, 计算出相应浓度。试验所有数据均用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理。数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

1.3.6.4 线性范围考察。分别精密吸取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 ml 的溶液于 25 ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 精密吸取上述各溶液 2 ml 于具塞试管中, 按照“1.3.6.3”方法测定吸光度。以吸光度对浓度进行线性回归, 得回归方程 $A = 68.703C + 0.0239$ ($r = 0.9995$), 结果表明, 葡萄糖在 2.0~14.0 μg/ml 线性关系良好。

2 结果与分析

2.1 草酸对黄芪细胞生长及黄芪多糖含量的影响 从草酸对黄芪细胞生长及黄芪多糖含量的影响(表 1)可以看出, 较低浓度(0.1、0.5 mmol/L)下草酸的添加对黄芪细胞的生长有一定的促进作用, 并随着草酸浓度的增加, 黄芪细胞的生物量的积累也逐渐上升; 但当草酸浓度高于 1.0 mmol/L, 对黄芪细胞的生长产生一定的抑制作用; 草酸浓度为 2.0 mmol/L, 黄芪细胞的干重降为对照组的 85.65%。而草酸的加入对于黄芪多糖的积累则表现出不一致的结果。试验浓度范围内, 黄芪多糖含量随着草酸浓度的增加而增加; 当草酸的浓度为 2.0 mmol/L, 黄芪多糖的含量也达最大, 为 35.245 mg/g, 为对照 1.80 倍。由此可见, 较高浓度的草酸虽然能抑制细胞生长, 却能显著提高黄芪细胞中黄芪多糖的含量。故在培养的第 0 天向培养体系中添加较高浓度的草酸(2.0 mmol/L), 利于黄芪细胞中黄芪多糖的积累。

表 1 草酸对黄芪细胞生长和细胞中黄芪多糖含量的影响

草酸浓度//mmol/L	干重//mg	增值倍数	多糖含量//mg/g
0	315.45 ± 4.807	5.15 ± 0.265	19.622 ± 0.470
0.1	335.09 ± 3.953	5.80 ± 0.138	21.775 ± 0.357*
0.5	348.81 ± 2.497	5.98 ± 0.066	24.174 ± 1.039*
1.0	296.84 ± 3.110	4.96 ± 0.146	29.235 ± 0.614*
2.0	270.18 ± 2.824	4.42 ± 0.227	35.245 ± 0.472*

注: * 表示与对照相比有显著差异 ($P < 0.01$)。

2.2 苯丙氨酸对黄芪细胞生长及黄芪多糖含量的影响 由苯丙氨酸对黄芪细胞生长及黄芪多糖积累的影响(表 2)可见, 试验浓度范围内的苯丙氨酸均能有效促进黄芪多糖的产生; 其中, 较低浓度范围苯丙氨酸更能有效促进黄芪细胞中黄芪多糖的合成; 当苯丙氨酸浓度为 1.0 mmol/L, 黄芪多糖的含量达最大, 为 33.429 mg/g, 为对照组的 1.70 倍。此外, 苯丙氨酸对黄芪细胞生物量的积累仅有轻微促进作用。随着加入苯丙氨酸浓度的增加, 收获的细胞干重质量相差不大, 均在 5.15~5.91 mg。故在培养的第 0 天向培养体系中 1.0 mmol/L 苯丙氨酸能有效提高苯丙氨酸的含量。

2.3 油酸对黄芪细胞生长及黄芪多糖含量的影响 由表 3

可见, 随着添加油酸浓度的增加, 黄芪细胞生物量的积累没有明显增加, 而黄芪细胞中黄芪多糖的含量却显著增加。这与添加苯丙氨酸的影响效果类似。添加 2.0 mmol/L 的油酸, 可使黄芪多糖的含量达 37.565 mg/g, 比对照组提高 1.91 倍, 而黄芪细胞生物量的积累仅为对照组的 1.19 倍。因此, 在培养的第 0 天, 向培养体系中添加 2.0 mmol/L 的油酸是促进黄芪悬浮细胞中黄芪积累的有效手段。

3 讨论

在植物细胞培养中加入特定的次生代谢物生物合成的前体进行饲喂培养能刺激植物细胞代谢途径中一些酶的活性, 进而提高次生代谢物产量和含量。李英华等报道向烟草

表 2 苯丙氨酸对黄芪细胞生长和细胞中黄芪多糖含量的影响

苯丙氨酸浓度//mmol/L	干重//mg	增殖倍数	多糖含量//mg/g
0	315.45 ± 4.807	5.15 ± 0.265	19.622 ± 0.470
0.1	319.14 ± 8.134	5.41 ± 0.123	22.398 ± 1.397
0.5	330.32 ± 2.734	5.70 ± 0.307	26.864 ± 0.819*
1.0	346.55 ± 5.760	5.82 ± 0.258	33.429 ± 0.738*
2.0	355.58 ± 1.793	5.91 ± 0.170	27.844 ± 0.659*

注: * 表示与对照相比有显著差异($P < 0.01$)。

表 3 油酸对黄芪细胞生长和细胞中黄芪多糖含量的影响

油酸浓度//mmol/L	干重//mg	增殖倍数	多糖含量//mg/g
0	315.45 ± 4.807	5.15 ± 0.265	19.622 ± 0.470
0.1	331.33 ± 3.449	5.70 ± 0.040	22.643 ± 0.712*
1.5	341.80 ± 7.082	5.85 ± 0.118	26.496 ± 0.890**
1.0	358.15 ± 2.459	6.19 ± 0.212	32.553 ± 0.965**
2.0	376.88 ± 5.405	6.57 ± 0.347	37.565 ± 1.301**

注: *、** 分别表示与对照相比有显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)差异。

NC89 悬浮培养细胞中添加了羟苯甲酸等前体物质,有效提高了辅酶 Q10 的含量和烟草细胞的干重^[7]。该试验在黄芪细胞悬浮培养时通过前体的追加来调控黄芪多糖代谢水平,结果发现,草酸的用量对黄芪多糖的合成有较大的影响,较低浓度的草酸能刺激细胞的生长,较高浓度的草酸能促进黄芪多糖的合成,而苯丙氨酸和油酸的添加对黄芪细胞生长和黄芪多糖合成的影响结果相一致,均表现轻微刺激细胞生长和显著促进黄芪多糖的合成,但二者最佳作用浓度不同。由此可以推断,前体促进细胞生长和次级代谢产物积累的作用机制可能不同,且前体的用量也是影响了次级代谢产物的合成的重要因素。

在植物细胞的次生代谢中,苯丙氨酸是一个代谢中间体,是生物碱、木质素、黄酮等多种次生代谢物质的生物合成的前体,同时在植物体内可以作为碳源和氮源,并通过参与蛋白质的生物合成来影响细胞生长^[8-9],因此苯丙氨酸被广泛用作前体物质附加在植物悬浮培养液中促进次生代谢产物的合成。Mizukami 等早在 1977 年就发现苯丙氨酸可以促进紫草细胞萘醌类化合物的合成^[10]。魏欣方等研究表明一定浓度的苯丙氨酸能促进红景天苷的产量^[11]。梁晓芳等进行大豆下胚轴悬浮细胞培养体系时,附加了一定浓度的苯丙氨酸,结果不仅显著提升了悬浮细胞中大豆素的积累,同时还有效促进了染料木素的含量^[12]。植物中草酸长期被认为是一种没有生理意义的代谢副产物,其对悬浮细胞培养过程中细胞生长和次生代谢物合成的影响也未见报道。但越来越多的研究表明,草酸可以调节植物细胞 Ca^{2+} 浓度,在植物适应环境胁迫中发挥重要功能^[13-15]。 Ca^{2+} 是一个重要的第二信使^[16],能诱导处理能促进次级代谢产物的合成,如周倩耘等分析指出 $CaCl_2$ 在较低的浓度下明显促进人参单体皂苷和总皂苷的积累,还能促进人参皂苷的分泌^[17]。在该试验中较高浓度的草酸促进了黄芪多糖的积累,抑制了细胞生长。邢更妹在研究黄芪组织培养产生多糖的代谢途径时指出脂肪酸是多糖合成的前体物之一,向黄芪愈伤组织培养体系添加前体物质油酸,黄芪多糖的含量明显增多^[18]。因此

该试验选择了油酸为前体进行追加,结果表明较高浓度的油酸能最大程度提高黄芪多糖的含量。

植物细胞悬浮培养过程中次生代谢物的产量通常较低,目前,提高植物细胞培养过程中次生代谢物产量的方法主要有前体饲喂、添加诱导子、两相培养、培养条件控制和高产细胞株的筛选等^[19]。许多研究表明 2 种或多种条件联合应用会对次生代谢产物的提高起到协同作用,如前体物质、诱导子和光照联合使用对葡萄细胞花青素含量有显著影响^[20]。该研究虽然成功地利用前体追加的方法提高了黄芪多糖的含量,但对于前体物质的最佳添加时间、对前体物质利用率高的细胞系筛选和多种促进因子联合作用等还有待进一步试验,从而筛选出有利于黄芪悬浮细胞中黄芪多糖积累的有效方法,为黄芪细胞的规模化培养奠定基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283-284.
- [2] 冯兴琴. 临洮县黄(红)芪无公害栽培技术要点[J]. 甘肃农业科技, 2011(11): 50-51.
- [3] 牛莹莹, 薛继婷, 范兴君. 牡丹江市医生吸烟现代及控烟的知识、态度和行为调查[J]. 牡丹江医学院学报, 2011, 32(1): 62-64.
- [4] 张延红, 陈红刚, 高素芳, 等. 基本培养基及激素和附加物对黄芪组织培养的影响[J]. 甘肃农业科技, 2011(3): 13-15.
- [5] 廉家盛, 高日, 吴松权, 等. 膜荚黄芪不定根组织培养的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(7): 2664-2665, 2667.
- [6] 步莹. 培养条件对黄芪细胞中几种次生物质含量的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2008.
- [7] 李英华, 吕春茂, 范海林, 等. 前体物质对烟草细胞辅酶 Q10 合成的影响[J]. 烟草科技, 2009(6): 51-55.
- [8] 方从兵, 宛晓春, 江昌俊. 黄酮类化合物生物合成的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32(4): 498-504.
- [9] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及调控[J]. 植物生理学通讯, 1988, 24(3): 9.
- [10] MIZUKAMI H, KONOSHIMA M, TABATA M. Effect of nutritional factors on shikonin derivative for maturation in *Lithospermum callus* cultures [J]. *Phytochemistry*, 1977, 16: 1183-1186.
- [11] 魏欣方, 周斌, 贾景明. 3 种前体饲喂对高山红景天悬浮培养细胞中红景天苷的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 83-86.
- [12] 梁晓芳, 朱学艺, 李红芳. 前体和诱导子对大豆悬浮细胞中异黄酮积累的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2009, 48(1): 113-118.
- [13] 彭新湘, 李明启. 植物中的草酸及其代谢[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(2): 93.

地利用有限的场地,使回填容量最大化,采取由远及近,由深及浅的施工方式,分层压实,达到节约成本的目的。

4.1.3 管网铺设。由于采区内及周边2 km范围内没有任何地表径流和地下水资源,加之土层稀薄,岩石裸露率大,保水肥力差等因素,因此在治理过程中,需在治理区域修建永久性蓄水池,全方位铺设管网,达到抗旱保苗的目的。

4.2 生物治理措施

4.2.1 适地适树,发挥乡土树种优势。充分发挥乡土树种适应性强、投资少、见效快、绿化效果好的特点,根据采区不同的地段选用不同苗龄及规格的树种,幼苗选择2年生、苗高50~60 cm,大苗选择苗高150~200 cm,容器规格以18 cm×18 cm为宜^[2]。充分发挥适地适树的作用。

(1)直立面(断崖、峭壁)。由于山体过于陡峭,造林施工困难,常规造林难以实施。因此,采用人工开挖种植穴、改阶梯、挂纤维网的方式,利用藤本植物的攀援性,攀爬断崖、峭壁或以喷灌的方式,喷灌草本植物,达到立体绿化的效果。藤本植物选择爬山虎、常春藤、地石榴藤等。

(2)采空区及堆料场。石场的主要作业地段,土层稀薄,岩石裸露,已丧失植被生长的基本要求。应通过大量回填土壤,以机械整地为主,人工整地为辅,依山就势,采用块状和点状配置方式,以乔、灌、草、藤及经济林木相结合的方式,在保证成活率的同时突显景观。树种初步选用旱冬瓜、滇合欢、五角枫、清香木、滇朴、无患子、冬樱花、火棘、核桃、石榴。

(3)偏坡。在山地改造和采空区回填时会出现一些偏坡,容易导致水土流失,树种选择时以防护树种为主,配以乔、灌、草、藤等植物。树种初步选用黄连木、侧柏、栓皮栎、滇朴、无患子、清香木。

4.2.2 科学整地,合理选用整地模式。科学合理地应用先进技术进行整地,促进保水保肥,提高苗木的成活率。

(1)直立面(断崖、峭壁)。种植穴应有足够的大小,可容纳苗木的全部根系并使其舒展开,避免栽植过深或过浅,有碍苗木的生长;喷播:运用特制喷混机械将土壤、有机核心料、粘结剂、植物种子等混合干料加水后喷射岩面,形成近10 cm厚度的具有大小孔隙的硬化体^[3]。

(2)采空区及堆料场。以机械整地为主,人工整地为辅实施整地,主要整地方式有①机械整地:对作业面积大,地势

相对平缓的地段,利用挖掘机械进行整地,提高工程效率;②穴状整地:根据苗木的根系、造林地情况确定整地规格,一般整地规格为40 cm×40 cm×40 cm,拣净石块,捣碎土块^[2]。大苗造林根据苗龄和不同树种根系情况按60 cm×60 cm×50 cm或大规格整地;③鱼鳞坑整地:将坑挖为鱼鳞形状,外高内低,半径不小于60 cm,起到汇水集水的作用。

(3)偏坡。为减少水土流失,尽可能地采用人工整地的方式进行治理。主要整地方式采用穴状整地、鱼鳞坑整地和喷播。

4.2.3 合理配置,高密度造林。由于“五采区”环境条件恶劣,植被恢复困难,植被恢复时首先应考虑保存率,应在保护好原生植被的前提下,加大造林密度,按株行距1 m×1 m、1.5 m×2 m、1.5 m×1.5 m造林。科学选用幼苗及大苗,以近自然的方式合理配置灌木、草本、藤本、经济林木,在保障生态效益的同时兼顾景观效益及可持续发展。

4.2.4 科学管护,严格封山育林。前期治理失败的一个主要原因就是管护力度不够,苗木栽下后,无人问津,因此制定科学合理的抚育管护和严格的封山育林措施是“五采区”植被恢复成功的关键。

5 保障措施

5.1 提高认识,加强政策引导“五采区”植被恢复是一项长期的治理工程,也是一个多部门、全社会参与的工程,各级部门要统一思想,提高认识,加强政策引导,广泛宣传,争取社会各界大力支持和积极参与。

5.2 强化科技,争取技术支撑充分利用现有的成熟技术,聘请各方面专家献计献策,积极与各科研院所建立联系,争取科学技术支撑,提高“五采区”植被恢复的成功率。

5.3 广开渠道,多方面吸纳资金“五采区”植被恢复时效长,投资大,涉及面广,在治理时要以政府为主导,灵活运用政策,广开渠道,引入企业参与,多方面吸纳资金,同时加大监管力度,确保工程质量,降低工程成本。

参考文献

- [1] 昆明市西山林场马鞍山片区“五采区”植被恢复示范项目作业设计[Z]. 2013.
- [2] 马骏. 林业栽培实用技术完全图解[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2013.
- [3] 刘刚. 废弃矿山生态快速恢复技术[J]. 上海地质, 2008(3): 16-17.

(上接第9319页)

- [14] VOLK G M, GOSS L J, FRANCESCHI V R. Calcium channels are involved in calcium oxalate crystal formation in specialized cells of *Pistia stratiotes* L[J]. *Annals of Botany*, 2004, 93: 741-753.
- [15] SANDERS D, BROWN LEE C, HARPER J F. Communicating with calcium[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 691-706.
- [16] 谢秋玲, 郭勇. 诱导剂对植物细胞培养生产次生代谢物的作用[J]. 生物工程进展, 1998, 18(4): 50-52.

- [17] 周倩耘, 周建民, 刘峻. 诱导子对人参毛状根中皂苷含量的影响[J]. 南京军医学院学报, 2003, 25(2): 76-78.
- [18] 邢更妹. 黄芪组织培养产生次生代谢产物——多糖过程的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 1999(1): 71-74.
- [19] 肖春桥, 张华香, 高洪. 促进植物细胞培养生产次生代谢物的几种途径[J]. 武汉化工学院学报, 2005, 27(1): 28-31.
- [20] 曲均革, 虞星炬, 张卫, 等. 前体饲喂、诱导子和光照联合使用对葡萄细胞培养合成花青素的影响[J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 299-304.