

太子参脱病毒技术研究

朱艳, 秦民坚^①, 周小华^②

(中国药科大学中药资源教研室, 江苏南京 210038)

摘要:采用茎尖分生组织法、热处理结合茎尖法、病毒唑处理结合茎尖法对6个不同产地的太子参[*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.]组培苗进行了脱病毒研究。经生物检测、ELISA法和电镜检测表明, 热处理结合茎尖法脱病毒效果最好, 脱毒率高达100%; 病毒唑处理结合茎尖法和茎尖分生组织法脱毒率分别为79.64%和74.29%。不同产地太子参的脱病毒效果不同。根据实验结果提出了太子参的脱病毒繁育程序, 其中复壮培养基中PP₃₃₃的最适浓度为0.5~1.0 mg·L⁻¹, 最适生根培养基为1/2 MS + 0.3 mg·L⁻¹ NAA。

关键词:太子参; 脱病毒; 脱病毒繁育程序

中图分类号: Q943.1; Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)04-0025-05

Studies on virus elimination of *Pseudostellaria heterophylla* ZHU Yan, QIN Min-jian^①, ZHOU Xiao-hua^② (Department of Traditional Chinese Medicine Material Resources, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(4): 25-29

Abstract: The virus elimination studies on *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. from 6 different geographical regions were carried out by the meristem-tip culture, the meristem-tip culture combining with thermotherapy or ribavirin methods. The de-virus seedlings were inspected by the biological test, ELISA and SEM methods. The results indicated that the de-virus rate of seedlings by means of the meristem-tip culture combining with thermotherapy or combining with ribavirin and the meristem-tip culture methods were 100.00%, 79.64% and 74.29% respectively. Different effects on virus elimination of the plants from different geographical regions were observed. The procedure of virus elimination of *P. heterophylla* was proposed. The results indicated that the most suitable concentration of PP₃₃₃ was 0.5~1.0 mg·L⁻¹ and the optimized medium for rooting was 1/2MS + 0.3 mg·L⁻¹ NAA.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.; virus elimination; procedure of virus elimination

太子参为石竹科(Caryophyllaceae)植物孩儿参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.] 的干燥块根, 是传统的用于滋补强壮的中药材, 具有益气健脾、生津润肺的功效^[1]。近年来临幊上报道太子参可与其他中药配伍用于治疗糖尿病、冠心病、小儿厌食等病, 也可用于保健食品及化妆品, 致使其市场需求量急剧增加。

太子参主产于江苏、山东、安徽和福建等省, 在中国有近百年的栽培历史。由于长期无性繁殖, 太子参体内感染并积累了多种病毒, 据报道主要含有TMV(烟草花叶病毒)、TuMV(芜菁花叶病毒)、CMV(黄瓜花叶病毒)和BBWV(蚕豆萎蔫病毒)4种病毒, 其中TuMV是江苏、山东和安徽等地太子参的主要病毒病原^[2], CMV是危害福建省太子参的主要病毒病原^[3]。目前对于太子参病毒病的防治还没有

有效的药物, 而通过诱导太子参茎尖分生组织获得脱病毒植株是去除太子参病毒病的最有效途径^[4~8]。为此, 本研究对来源于6个不同产地的太子参进行了脱病毒培养, 比较了茎尖分生组织法、热处理结合茎尖法和病毒唑处理结合茎尖法3种方法的脱病毒效果, 并针对优质产地进行了脱毒苗复壮和生根等一系列优化实验, 从而为太子参的大田生产提供优质种源。

收稿日期: 2004-12-21

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK200176)

作者简介: 朱艳(1972-), 女, 江苏吴江人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事药用植物种质保存和生物技术等方面的研究。

① 通讯作者 E-mail: minjianqin@sohu.com

② 中国药科大学2004届实习生, 参加部分实验工作。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试太子参种源分别采自江苏溧阳、山东临沂、安徽宣城、辽宁凤城(野生)、贵州施秉和福建柘荣,栽培于中国药科大学药用植物园。原植物经作者鉴定为太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.]。TuMV、TMV、CMV 抗血清由江苏省农业科学研究院植物保护研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 太子参无菌苗的获得 选取不同产地太子参植株,按常规方法消毒,将分别带有顶芽与腋芽的切段植于 MS 培养基(含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 3% 蔗糖)中^[9],各产地分别接种 20 瓶,每瓶 5~6 个切段,培养 20 d,待芽长至约 2 cm 时,切取芽体,用相同培养基繁殖扩增。每天光照 10 h,光照强度 1 500~2 000 lx,培养温度(25 ± 1)℃。

1.2.2 太子参脱毒苗的制备 选取不同产地生长健壮的太子参植株,按常规方法消毒,或以太子参无菌苗作为脱毒苗制备的材料。均接种 30 瓶,每瓶 5~6 个。脱病毒采用以下 3 种方法进行:

1.2.2.1 茎尖分生组织法 取无菌苗的顶芽或侧芽于双筒解剖镜下,切取带 1~2 个叶原基长约 0.2~0.5 mm 的茎尖分生组织,迅速接种于启动培养基上。启动培养基以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的生长素和细胞分裂素(6-BA、KT、NAA 和 GA)。培养 30 d,统计出芽数并记录生长情况。培养条件:每天光照 14 h,光照强度 1 200 lx,培养温度(25 ± 1)℃。

1.2.2.2 热处理结合茎尖法 取由不同产地太子参的茎尖分生组织诱导出的已分化出 3~4 片叶的组培苗,转接于 $\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的增殖培养基上,置于 LRH-250-G 型光照培养箱中,经 38℃、1 000 lx 连续培养 30 d。

1.2.2.3 病毒唑处理结合茎尖法 取由不同产地太子参的茎尖分生组织诱导出的已分化出 3~4 片叶的组培苗,转接于添加了 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 病毒唑的增殖培养基($\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA)上培养 30 d。培养条件同茎尖分生组织法。

1.2.3 脱毒检测 采用生物法和血清学法对脱毒苗进行脱毒检测,并用电镜法进行验证。

1.2.3.1 生物法^[10] 取已脱毒的组培苗,加入 2 mL $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0)研磨,将汁液摩擦接种于四叶期的白花曼陀罗和苋色藜上观察症状。

1.2.3.2 血清学法 以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液(pH 9.6)为包被液,组培苗匀浆液离心后取上清液进行 ELISE 法检测^[5],用 Safire 自动酶标仪测量 492 nm 处的光吸收值,吸收值小于阴性对照吸收值 2 倍者,定为阴性,不带病毒。

1.2.3.3 电镜法 采用田波等的方法^[11],于 H-7000 型电镜下进行检测,以验证上述检测方法的可靠性,阳性对照为明显感染太子参病毒病的栽培苗。

1.2.4 脱毒苗的复壮培养 选取太子参脱毒苗进行单节培养,在增殖培养基($\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA)中分别添加 0、 0.1 、 0.5 、 1.0 、 2.0 和 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP₃₃₃,每处理接种 20 瓶,每瓶 5~6 节。培养条件:每天光照 10 h,光照强度 1 500~2 000 lx,培养温度(25 ± 1)℃。培养 30 d 后,观察苗的生长情况及节间长度及茎直径。

1.2.5 生根培养基的筛选 将高约 3 cm 具 1~2 节的太子参脱毒苗接种于添加了不同生长素组合的 1/2MS 培养基上,每处理接种 20 瓶,每瓶 5~6 株。培养条件:每天光照 10 h,光照强度 1 500~2 000 lx,培养温度(25 ± 1)℃。培养 30 d 后,观察试管苗的生根状况,并统计生根率。

2 结果和分析

2.1 太子参茎尖启动培养基的筛选

将太子参茎尖分生组织接种于含不同浓度生长素和细胞分裂素的培养基上,30 d 后太子参茎尖的启动生长状况见表 1。结果表明,6-BA 比 KT 更适宜于太子参茎尖分生组织的培养;同时使用 6-BA 和 KT 2 种细胞分裂素时,出现细胞分裂过快,叶绿素合成滞后等现象,并产生绿色略透明的玻璃化苗;较高浓度的 6-BA 和 NAA 配合使用,茎尖诱导的丛生芽少,颜色较浅;低浓度的 6-BA 和 NAA 配合使用时具有较好的效果,其中以 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 为较理想的激素组合,茎尖启动及生长情况均优于其他培养基,植株无玻璃化现象,新生叶片舒展,叶色正常,节间较长。由此,确定太子参茎尖启动培养基为 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA +

$0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

2.2 太子参脱毒苗制备方法的比较

用3种方法制备太子参脱毒苗,实验结果见表2。由表2可见,使用热处理结合茎尖法和病毒唑结合茎尖法制备脱毒苗,脱毒苗生长迟缓或不生长,部分试管苗甚至死亡。不同产地间以来源于江苏溧阳的采用茎尖分生组织法制备的脱毒苗成苗率最高,达77.94%;而来源于山东临沂的采用热处理结

合茎尖法制备的太子参脱毒苗成苗率最低,为46.15%。3种方法间比较,以茎尖分生组织法成苗率较高,其次为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 病毒唑处理,热处理成苗率最低,导致热处理成苗率低的主要原因是出现较多的玻璃化苗。

2.3 脱病毒效果检测

对采用3种方法制备的组培苗进行脱毒检测,首先进行生物检测,凡接种到白花曼陀罗或苋色藜

表1 不同激素组合和浓度对太子参茎尖启动培养的影响(30 d)

Table 1 Effects of different combinations and concentrations of phytohormones on meristem-tip culture of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. (30d)

培养基编号 No. of medium	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration of phytohormone				启动天数/d Day of startup	苗高/cm Height of plantlet	丛生芽 Cluster bud	生长情况 Growth state
	6-BA	KT	NAA	GA				
T1	-	2.0	0.2	-	4-5	1-2	无 Nothing	仅启动 Only startup
T2	2.0	-	0.2	-	5-6	2-3	少量 Less	一般,浅绿色 Average, aqua
T3	2.0	-	0.2	0.1	4-5	2-3	少量 Less	一般,浅绿色 Average, aqua
T4	2.0	-	0.5	-	5-6	1-2	较少 Little	一般,浅绿色 Average, aqua
T5	2.0	-	1.0	-	5-6	1-2	无 Nothing	一般,浅绿色 Average, aqua
T6	0.5	-	0.2	-	5-6	4-6	较多 More	良好,深绿色 Best, dark green
T7	1.0	-	0.2	-	5-6	4-6	较多 More	较好,绿色 Better, green
T8	1.5	-	0.2	-	5-6	4-6	较多 More	一般,绿色 Average, green
T9	1.0	0.1	0.1	-	6-7	0.5-1	玻璃化 Vitrification	一般,浅绿色 Average, aqua
T10	2.0	0.5	0.2	-	6-7	0.5-1	玻璃化 Vitrification	一般,浅绿色 Average, aqua

表2 3种太子参脱毒苗制备方法比较

Table 2 A comparison of three methods to producing de-virus seedling of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.

方法 ¹⁾ Method ¹⁾	产地 Location	接种数 Number of inoculation	株数 Number of seedling	成活率/% Survival rate	鉴定株数 Number of identify seedling	脱毒株数 Number of de-virus seedling	脱毒率/% De-virus rate
MC	江苏溧阳 Liyang, Jiangsu	136	106	77.94	45	34	75.56
	山东临沂 Linyi, Shandong	123	81	65.85	35	20	57.14
	安徽宣城 Xuancheng, Anhui	128	93	72.66	35	18	51.43
	辽宁凤城 Fengcheng, Liaoning	25	15	60.00	15	13	86.67
	贵州施秉 Shibing, Guizhou	139	108	77.70	30	25	83.33
	福建柘荣 Zherong, Fujian	132	99	75.00	50	46	92.00
MCT	江苏溧阳 Liyang, Jiangsu	95	49	51.04	49	49	100.00
	山东临沂 Linyi, Shandong	65	30	46.15	30	26	86.67
	安徽宣城 Xuancheng, Anhui	49	23	46.94	23	19	82.61
	辽宁凤城 Fengcheng, Liaoning	25	14	56.00	14	14	100.00
	贵州施秉 Shibing, Guizhou	42	27	64.29	27	26	96.30
	福建柘荣 Zherong, Fujian	50	32	64.00	32	32	100.00
MCR	江苏溧阳 Liyang, Jiangsu	80	50	62.50	50	43	86.00
	山东临沂 Linyi, Shandong	40	23	57.50	23	14	60.87
	安徽宣城 Xuancheng, Anhui	40	27	67.50	27	17	62.96
	辽宁凤城 Fengcheng, Liaoning	24	14	58.33	14	13	92.86
	贵州施秉 Shibing, Guizhou	26	18	69.23	18	16	88.89
	福建柘荣 Zherong, Fujian	50	35	70.00	35	33	94.29

¹⁾ MC: 茎尖分生组织法 Meristem-tip culture; MCT: 热处理结合茎尖法 Meristem-tip culture combining with thermotherapy; MCR: 病毒唑结合茎尖法 Meristem-tip culture combining with ribavirin.

上出现花叶等症状的脱毒苗予以淘汰,在此基础上进行ELISA检测。由于BBWV分布非常少,仅在江苏的极少部分样品中分离到,故在ELISA检测中未进行BBWV检测。TuMV、TMV和CMV抗血清稀释度为1:1 000,辣根过氧化物酶羊抗兔IgG稀释度为1:1 000。结果表明(见表2):采用茎尖分生组织法所制备的脱毒苗中被检植株阴性率平均达74.29%,热处理结合茎尖法制备的脱毒苗中被检植株阴性率平均达94.86%,病毒唑结合茎尖法制备的脱毒苗中被检植株的阴性率平均达79.64%。最后经电镜检测,所有的阴性样品中均未观察到杆状、线状和球状的病毒粒子,证明了上述检测方法的结果是可靠的。

从表2可以看出,脱毒率效果最好的方法为热处理结合茎尖法,其中来源于福建柘荣、辽宁凤城、江苏溧阳3个产地的太子参脱毒苗脱毒率达到100.00%,来源于贵州施秉、山东临沂和安徽宣城的太子参脱毒苗脱毒率也明显高于其他2种方法;病毒唑处理结合茎尖法的脱毒效果其次,其中来源于福建柘荣的太子参脱毒率达到94.29%;茎尖分生组织法脱毒率在51.43%~92.00%之间。病毒唑处理虽然有助于茎尖分生组织脱病毒,但是其对丛生芽

生长有抑制作用,不宜长期使用。综合考虑认为,热处理结合茎尖法是较理想的太子参脱毒苗制备方法。

2.4 太子参脱毒快繁程序的建立

根据不同产地太子参品质的分析^[12],6个产地中以产自福建柘荣的太子参中多糖和总皂苷含量最高,因此,结合脱病毒实验的结果,针对来源于福建柘荣的太子参脱毒苗进行了复壮实验和生根培养基优化等技术的研究,并提出了太子参脱毒繁育程序。

2.4.1 脱毒苗的复壮培养 根据太子参脱毒苗较高、节较多的特点,对脱毒苗进行单节培养,其中增殖培养基中添加了不同浓度的生长延缓剂PP₃₃₃。由表3可见,PP₃₃₃对太子参脱毒苗的生长有显著的矮化作用,随着添加浓度的增加,其矮化作用更加明显,脱毒苗的节间明显缩短,茎明显增粗。当浓度增至2.0和5.0 mg·L⁻¹时,脱毒苗过于矮化,不利于扩大繁殖与生根移栽。因此,PP₃₃₃的适宜浓度为0.5~1.0 mg·L⁻¹。在实验中还发现通过该法扩繁的太子参脱毒苗在繁殖过程中极少变异,这对于保持脱毒苗的遗传稳定性具有重要意义。

表3 不同浓度PP₃₃₃对太子参脱毒苗生长的影响(30d)¹⁾

Table 3 Effects of different concentrations of PP₃₃₃ on growth of de-virus seedling of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. (30d)¹⁾

处理组 Treatment	PP ₃₃₃ 浓度/mg·L ⁻¹ Concentration of PP ₃₃₃	节间长度/mm Length of internode	茎直径/cm Diameter of stem	叶片特征 Feature of leaf
1	0.0	17.70	0.68	小,浅绿 Small, aqua
2	0.1	15.20	0.73	小,浅绿 Small, aqua
3	0.5	12.12	0.85	大,绿色 Big, green
4	1.0	8.71	0.92	大,绿色 Big, green
5	2.0	5.06	1.02	巨大,深绿色 Huge, dark green
6	5.0	2.34	1.24	巨大,深绿色 Huge, dark green

¹⁾节间长度和茎直径数据为30个随机抽样的平均值 Data on internode length and stem diameter are average values of 30 random samples

2.4.2 生根培养基筛选 实验发现,太子参脱毒苗可以在不附加任何激素的1/2 MS培养基上自发生根,生根率可达51.01%(见表4),但启动天数较长,根少且细弱,不利于脱毒苗的移栽。而在添加了不同浓度的IAA、NAA和IBA的培养基上,太子参脱毒苗的生根率、根数、根的粗壮度均得到一定改善,其中添加了0.3 mg·L⁻¹NAA的1/2MS培养基对脱毒苗根的分化和生长有明显的促进作用,因此可作为太子参脱毒苗的生根培养基。

2.4.3 太子参脱毒繁育程序 综合上述实验结果,

选取来源于福建柘荣的太子参生长健壮的优良母株进行热处理结合茎尖法培养,从而确立具体的脱毒繁育程序如下:

优良母株,经消毒后,切取0.2~0.5 mm茎尖于启动培养基上培养,所得到的茎尖分生组织苗,经38℃热处理培养后,首先经生物检测和ELISA检测确定为无病毒,再经电镜检测确定为脱毒苗,于复壮培养基上复壮、扩繁,移至生根培养基上培养,驯化成苗,即为太子参原原种,置于无病毒温室培养保存,即为原种,形成太子参良种。

表4 不同激素组合和浓度对太子参脱毒苗生根的影响(20 d)
Table 4 Effects of different combinations and concentrations of phytohormones on root inducing of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. plantlet (20 d)

培养基编号 No. of medium	浓度/mg·L ⁻¹ Concentration			启动天数/d Day of startup	生根数 Number	生根率/% Rate of rootage
	IAA	NAA	IBA			
S1(MS)	-	0.1	-	12	2~4	21.55
S2(1/2MS)	-	-	-	10	2~6	51.01
S3(1/2MS)	-	0.1	-	6	4~15	92.50
S4(1/2MS)	-	0.3	-	9	3~15	100.00
S5(1/2MS)	-	0.5	-	10	2~10	85.72
S6(1/2MS)	0.1	-	-	9	3~10	62.63
S7(1/2MS)	-	-	0.1	7	4~9	90.25

3 讨 论

在研究中发现,采取茎尖分生组织培养与热处理相结合的方法,培育出的太子参苗脱毒率高达100%,而且对茎尖分生组织苗进行热处理,易控制条件,设备简单,处理苗量大,效果好。

在太子参茎尖分生组织培养过程中,向培养基中添加微量的间苯二酚^[13],可以促进茎尖分生组织的增殖和新根数的增加,提高成功率,具体原因有待进一步的研究。

植物生长延缓剂PP₃₃₃是目前广泛应用于农业和园艺的植物生长调节剂之一,具有明显的矮壮作用。PP₃₃₃在太子参脱毒苗复壮中起着重要作用,当其与外源激素配合使用时,能有效地调控太子参脱毒苗的生长。研究中还发现太子参通过单节培养方法扩

增的脱毒苗在繁殖过程中极少变异,这对于保持脱毒苗的遗传稳定性具有重要意义。

参考文献:

- [1] 肖培根,李大鹏,杨世林.新编中药志(第一卷)[M].北京:化学工业出版社,2002. 191~193.
- [2] 陆家云,曹以勤,龚浩,等.药用植物病害[M].北京:中国农业出版社,1995. 23~25.
- [3] 黄勇毅,林从发.闽东太子参花叶病发病规律调查及防治途径研究[J].宁德师专学报(自然科学版),2004,16(1): 65~68.
- [4] 刘清琪,陈绳亮,陈隶华,等.太子参花叶病病原及其防治的初步研究[J].中药材科技,1983(2): 11.
- [5] 高玮,张敬水,张建红,等.太子参花叶病毒的检测与防治[J].中国病毒学,1993,8(4): 390~393.
- [6] 温学森,霍德兰,赵华英.太子参常见病害及防治[J].中药材,2003,26(4): 243~245.
- [7] 宋荣浩,濮祖芹.太子参病毒病的防治途径[J].上海农业学报,1994,10(4): 59~62.
- [8] 林从发,钟爱清,魏泽平,等.太子参组培快繁技术研究初报[J].福建农业科技,2002(6): 22.
- [9] 谈献和,巢建国,张瑜,等.太子参快速繁殖研究[J].中药材,2003,26(2): 82~83.
- [10] 宋荣浩.太子参病毒病的病原鉴定及防治途径的研究[D].南京:南京农业大学,1987. 16~18.
- [11] 田波,裴美云.植物病毒研究方法(上册)[M].北京:科学出版社,1987. 198~202.
- [12] 余永邦.太子参的种质资源与品质评价研究[D].南京:中国药科大学,2004. 75~76.
- [13] 胡琳.植物脱毒技术[M].北京:中国农业大学出版社,2000:43.

(责任编辑:惠红)

欢迎订阅《中南药学》杂志

《中南药学》杂志是由湖南省药学会主办,国内外公开发行的药学综合性学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN1672-2981;国内统一连续出版物号:CN43-1408/R。

本刊内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、生化药物、中药及天然药物、医院药学、药学教育等。主要栏目有综述、专家论坛、专题讲座、研究论文、中药与天然药物、新药之窗、药物与临床、合理用药与临床药学和药物不良反应、临床用药问题解答、研究生论文、学术争鸣、药物信息动态、药事管理和药界精英等。

本刊为双月刊,大16开本,64页,印刷装帧精美。逢双月20日出版,定价10.00元/册。如需订阅,可到当地邮局(邮发代号42-290)或直接汇款至杂志社订购,全年订价60元。

地址:长沙市人民中路139号中南大学湘雅二医院内《中南药学》杂志社,邮编:410011;电话:0731-4895602;传真:0731-2258487;E-mail:hnyxh@public.cs.hn.cn或znyx@sina.com。开户行:兴业银行长沙韶山路支行,银行帐号:368150100100034745。