

# 不同激素配比对白及愈伤组织诱导、增殖和分化的影响

徐德林<sup>1</sup>, 沈 访<sup>2</sup>, 钱 刚<sup>1</sup>, 乔晓颖<sup>2</sup>, 储士润<sup>2</sup>, 李 林<sup>1</sup>

(1. 遵义医学院 细胞生物学教研室, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义医学院 第一临床学院, 贵州 遵义 563000)

**摘 要:**以白及为试材,以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,研究了愈伤组织诱导、增殖和分化培养基中的最佳激素种类和浓度配比。结果表明:在 MS 中添加 6-BA  $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 2,4-D  $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时白及愈伤的诱导率最高,达 89.89%。2,4-D 是诱导白及愈伤生成的关键激素,而在基本培养基中单添加 6-BA 时并不能诱导愈伤组织的生成,同时添加 2,4-D 和 6-BA 能有效促进愈伤的诱导,且愈伤诱导率随着 2,4-D 浓度的增加而逐渐增加,但优质愈伤率也随之降低。添加 6-BA  $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 2,4-D  $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的增殖培养基中愈伤细胞的增殖率最高,30 d 的增殖倍数达 7.457。在分化培养基中添加 NAA 和 TDZ 有利于白及愈伤组织分化,分化率随着二者浓度的增加而增加,且 NAA 的促分化效果优于 TDZ。MS+2,4-D  $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为最佳分化培养基,分化 30 d 时其分化率为 86.67%。

**关键词:**白及;愈伤组织;诱导;增殖;分化;培养基配方

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0157-05

白及(*Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f.)是医药、工业、园艺的重要原材料。白及假鳞茎是一种常用的中药材,具有抗菌、止血收敛、消肿生肌之功效<sup>[1-3]</sup>,能通过影响巨噬细胞来提高伤口的愈合能力<sup>[4]</sup>。近年的药理学研究还发现,白及能合成大量的超氧化物,具有抗菌镇痛及抑制癌细胞增殖作用<sup>[1,5]</sup>。此外,白及还被广泛用

作护肤化妆品、高档卷烟烟蒂胶、工业糊料、浆丝绸、浆纱、涂料、酿酒等工业原料。由于市场需求不断增加,白及的价格持续增高。然而,白及野生资源已日渐枯竭,已被我国列为珍稀濒危的中药物种,同时也被国际贸易公约(CITES)附录二录入加以保护<sup>[6]</sup>。因此,建立与优化白及药用品种的组织快繁体系不仅已成为白及的产业化种植过程中迫切需要解决的重大问题,也是保护白及野生资源的重要手段。

前人关于白及的组织快繁多以种子<sup>[7]</sup>、腋芽<sup>[8]</sup>等为外植体直接诱导出幼苗,利用白及种子诱导出愈伤组织并建立快繁体系的文献报道甚少<sup>[7]</sup>。该研究以白及种子为供试材料,在 MS、1/2MS 培养基中添加不同配比的激素,比较不同激素对白及愈伤组织的诱导、质量、增殖等的影响,最终建立优化白及的快繁体系,为白及中药现代化进程中标准化生产奠定物质和试验基础。

**第一作者简介:**徐德林(1981-),男,博士,副教授,研究方向为中药材遗传育种。E-mail:xudelinq2000@163.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31560079);贵州省中药现代化科技产业研究开发专项资助项目(黔科合 ZY 字[2013]3002 号);贵州省科技厅、遵义医学院、遵义市科技局联合基金重点资助项目(黔科合 LH 字[2014]7549 号);贵州省教育厅 2013 年大学生创新创业训练计划资助项目(201410661019);遵义医学院 2013 年大学生创新资助项目(院发[2013]6516)。

**收稿日期:**2016-02-14

**Abstract:** Taking *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach as material, the content of extracellular polysaccharide as the response value, on the basis of single factor experiment, the effect of different nutritional factors on the content of extracellular polysaccharide were researched by the response surface methodology with 4 factors and 4 levels to determined the optimum culture medium. The results showed that the best culture medium for fermentation extracellular polysaccharide of the *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach was mannitol  $19.83\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , peptone  $6.35\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , vitamin B<sub>2</sub>  $1.61\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , iron sulfate  $0.42\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the highest production of extracellular polysaccharide reached  $2.002\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , which was identical to the response surface prediction value.

**Keywords:** response surface methodology; *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach; extracellular polysaccharide; culture medium; optimizing

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为贵州正安和赤水的成熟白及蒴果,置于4℃冰箱保存备用。含有 Tween-80(浓度为 $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ )的0.1%升汞溶液,6-BA、2,4-D、TDZ 和 NAA 均为Sigma公司生产的分析纯试剂。

BL-100A 高压灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),CJHS 洁净工作台(天津市泰斯特仪器有限公司),MP2002 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),PHS-3G 精密 pH 仪(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 白及种子的消毒 取未开裂蒴果,无菌水洗净;用75%酒精浸泡15 s,无菌水洗1 min 去除酒精;用含有 Tween-80(浓度为 $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ )的0.1%升汞浸泡10 min,浸泡过程中不断轻摇,再用无菌水冲洗5次以去除升汞残留,每次5 min;用无菌滤纸吸干蒴果表面的水分,备用。

1.2.2 白及愈伤组织诱导及诱导培养基优化 在洁净工作台中将消毒好备用的白及蒴果沿纵径剖开一个小口,用镊子夹住蒴果的蒂部,轻轻抖动,将种子抖落在无菌滤纸上;用镊子夹起种子并均匀播撒入诱导培养基中。每个诱导培养基重复3次。7 d后将膨大的种子转入对应的诱导培养基中。30 d后,分别统计不同诱导培养基下的愈伤诱导率、优质愈伤率。愈伤诱导率(%)=愈伤组织数/接入外植体数 $\times 100$ ,优质愈伤率(%)=黄绿色愈伤组织数/愈伤组织总数 $\times$ 愈伤诱导率 $\times 100$ 。

1.2.3 白及愈伤组织增殖及其培养基优化 以 MS+6-BA  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为基本培养基,分别添加不同浓度2,4-D(0、1、2、3、4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )。选择诱导培养基(MS+2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )诱导出的直径大小约0.15 cm的愈伤组织分别接入增殖培养基中培养,30 d后,调查愈伤组织的增殖倍数。增殖倍数=培养后愈伤组织质量(g)/接入时愈伤组织质量(g)。

1.2.4 白及愈伤组织分化及其培养基优化 以 MS 培养基+6-BA  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D  $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为基本培养基,分别添加不同浓度的 NAA 或 TDZ 作为分化培养基。选择诱导培养基(MS+6-BA  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )诱导出直径大小约0.15 cm的愈伤组织分别接入分化培养基中培养,30 d后统计不同分化培养基下的愈伤出芽数,计算愈伤分化率,比较得到白及愈伤组织分化的最佳培养基。愈伤分化率(%)=出芽的愈伤组织数/愈伤组织总数 $\times 100$ 。

以上所用培养基均为添加了蔗糖  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂  $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 MS 或 1/2MS 基本培养基,培养基中的 pH 调节至 5.8~6.0,配制好的培养基均在高温灭菌锅中  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 25 min。愈伤组织生长条件:温度  $25\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光强  $1\ 500\sim 2\ 500\text{ lx}$ 、相对湿度  $55\%\sim 65\%$ 、光照周期  $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 白及愈伤组织的诱导

2.1.1 诱导激素筛选 以 MS 与 1/2MS 为基本培养基,分别添加  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 6-BA 或 2,4-D 作为诱导培养基,比较不同激素诱导愈伤组织的效果。发现接种后白及种子吸水膨大,7 d 后由淡黄色逐渐变为淡黄绿色的球形颗粒。20 d 时未添加激素与仅添加了 6-BA 的 MS、1/2MS 培养基中可见白及幼芽,30 d 后即分化出小苗,但并无愈伤组织细胞形成。而在仅添加了 2,4-D 的 MS、1/2MS 培养基中,诱导 20 d 后种子形成球形颗粒并随着诱导时间逐渐增大,形成愈伤(图 1)。

2.1.2 诱导培养基优化 在 MS 和 1/2MS 中添加不同浓度 6-BA 和 2,4-D,发现添加浓度不同,诱导培养基中白及愈伤诱导率以及优质愈伤率有着显著性的变化( $P\leq 0.05$ )(图 2)。以 MS 为基本培养基时,与诱导培养基(MS+2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )相比,添加了 6-BA  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的诱导培养基中白及的愈伤诱导率升高至 74.74%,但优质愈伤的诱导率无显著性变化。这说明在 MS 基本培养基中,添加 6-BA 有利于白及愈伤组织的诱导,但对优质愈伤率无显著的影响。添加 6-BA 后继续添加 2,4-D  $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,愈伤诱导率与优质愈伤率均会显著下降;添加 2,4-D 至  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,愈伤诱导率增加至 89.89%,但优质愈伤率却降低至 22.5%。表明 2,4-D 的增加能提高愈伤诱导率,但对愈伤质量有不利影响。在 1/2MS 基本培养基中,当添加 6-BA  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时愈伤诱导率和优质愈伤率显著低于仅添加了 2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的处理,随着添加 2,4-D 浓度的增加,愈伤诱导率回升,但仍低于仅添加了 2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的诱导培养基,优质愈伤率在 2,4-D 为  $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时增加,在 2,4-D 为  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时降低,并且都与不添加 6-BA 的诱导培养基存在显著差异。这说明在 1/2MS 基本培养基下,6-BA 添加不利于愈伤的诱导,但 2,4-D 的增加可以提高愈伤诱导率,对愈伤质量的改良并无显著影响。仅添加 2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 1/2MS 培养基中的优质愈伤率最高,达 78.79%,且与 MS 培养基中添加 2,4-D  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的诱导的愈伤相比诱导率无显著性变化。

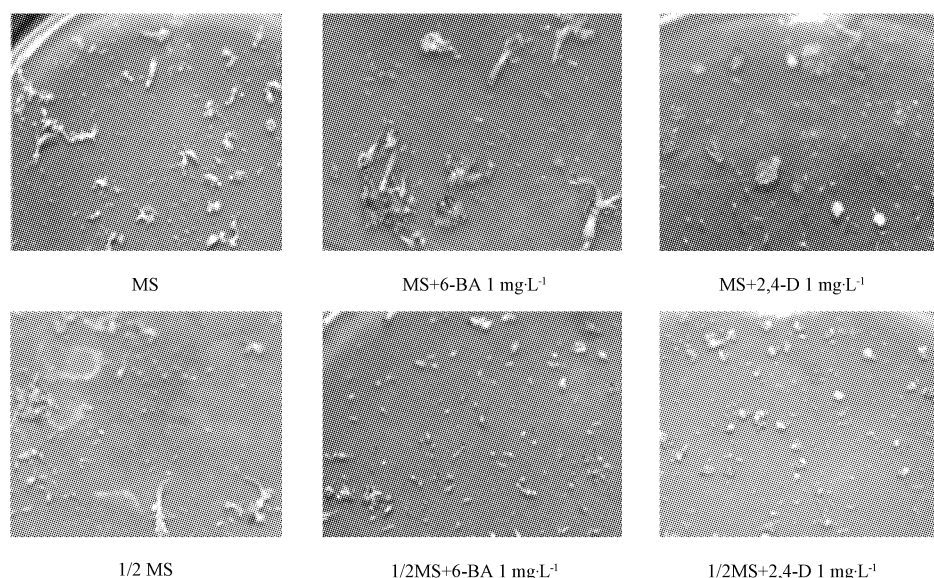
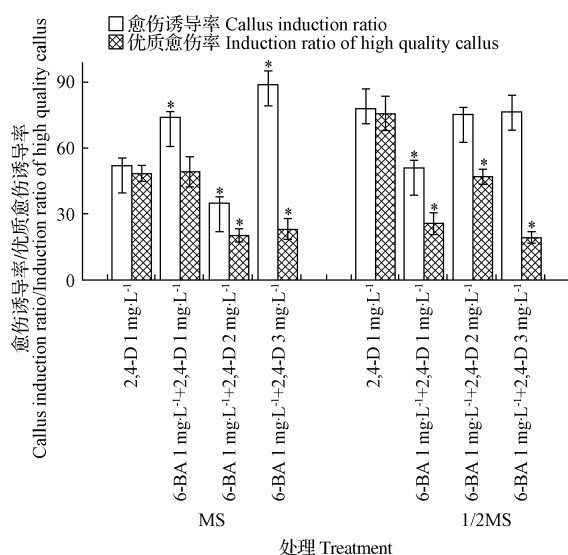


图 1 不同的激素与基本培养基对愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 The effect of different hormones added in basic medium on callus induction



注: \* 表示其它处理与 2,4-D 1 mg·L<sup>-1</sup>相比在 0.05 水平有显著差异。

Note: \* indicated the significant difference with the medium of 2,4-D 1 mg·L<sup>-1</sup> at 0.05 level.

图 2 不同激素浓度对白及愈伤诱导的影响

Fig. 2 Statistical of callus affected by different hormones

## 2.2 白及愈伤组织的增殖

白及的愈伤组织在添加了不同浓度的 2,4-D 的培养基中进行增殖培养,结果发现当 2,4-D 浓度在 0~2 mg·L<sup>-1</sup>时,愈伤组织的增殖倍数均≥7.00,且随着 2,4-D 浓度的增加,增殖倍数无显著差异( $P \geq 0.05$ ,图 3)。当 2,4-D 浓度继续增加到 2 mg·L<sup>-1</sup>以上时,愈伤组织的增殖倍数随着 2,4-D 浓度增加而逐渐降低。增殖培养基 MS+6-BA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>中愈伤组织随着培养时间

的增长,愈伤组织的质地越来越致密,甚至分化出根、茎、叶。因此,2,4-D 添加可促进愈伤组织的增殖,并且 2,4-D 添加浓度在 0~2 mg·L<sup>-1</sup>内具有较高的增殖倍数,其中以 MS+6-BA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 2 mg·L<sup>-1</sup>培养基的增殖倍数最高,达 7.457 倍,同时愈伤组织的质地更加疏松,呈淡黄色、生长迅速。

## 2.3 白及愈伤组织的分化

将诱导培养基(MS+6-BA 1 mg·L<sup>-1</sup>+2,4-D 1 mg·L<sup>-1</sup>)下的愈伤组织转入不同的分化培养基,比较不同激素对白及愈伤组织分化的影响。不同激素配比的分化培养基及其对应的分化率如表 1 所示。结果表明,在 FH1 基础上分别添加不同浓度 NAA 的分化培养基 FH2、FH3 中均未能分化出芽。而不含有 2,4-D 或 6-BA 的分化培养基 FH4、FH5 在添加了 NAA 后能分化出芽,并且不含 6-BA 的分化培养基 FH5 的分化率更是高达 86.67%,显著的高于不含 2,4-D 的分化培养基 FH4。而仅添加了 TDZ 的分化培养 FH6、FH7 能分化出幼芽。加入 TDZ 0.5 mg·L<sup>-1</sup>时,愈伤的分化率为 33.33%,加入 TDZ 1.0 mg·L<sup>-1</sup>时,愈伤的分化率为 56.67%,且分化率随其 TDZ 浓度的增加而增加。这说明 TDZ 和 NAA 对白及愈伤组织的分化具有积极的作用,但 TDZ 的效果要优于 NAA。同时,也发现 6-BA 和 2,4-D 均会抑制白及愈伤组织的分化,且 6-BA 的抑制效果更加的突出;在不含有 6-BA,但添加有高浓度 NAA 的 FH5 分化培养基是 7 种分化培养基中促进白及愈伤组织分化效果最佳的培养基。



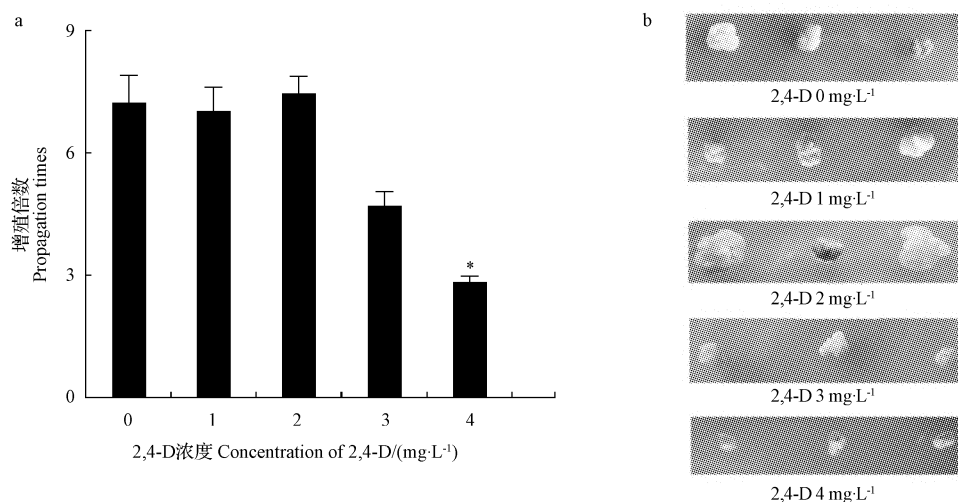


图3 不同培养基中愈伤组织的增殖情况

Fig. 3 The proliferation of callus in different medium

表 1

白及愈伤组织在不同培养基中分化率比较

Table 1

Statistical analysis of differentiation rate of callus in different media

培养基编号 Medium	基本培养基 Basic medium	6-BA 6-Benzylaminopurine /(mg · L <sup>-1</sup> )	2,4-D 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid /(mg · L <sup>-1</sup> )	NAA α-Naphthylacetic acid /(mg · L <sup>-1</sup> )	TDZ Thidiazuron /(mg · L <sup>-1</sup> )	分化率 Differentiation rate/%
FH1	MS	0.1	2	0.0	0.0	0
FH2	MS	0.1	2	0.5	0.0	0
FH3	MS	0.1	2	1.0	0.0	0
FH4	MS	0.1	0	1.0	0.0	50.00b
FH5	MS	0.0	2	1.0	0.0	86.67a
FH6	MS	0.1	2	0.0	0.5	33.33c
FH7	MS	0.1	2	0.0	1.0	56.67b

注:不同小写字母表示在 0.05 水平存在显著差异。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

### 3 讨论与结论

该研究以白及最佳外植体种子为材料<sup>[8]</sup>,在愈伤组织诱导阶段,不加激素或只添加 6-BA 的培养基未能诱导出愈伤组织,而单独添加 2,4-D 即能够诱导出绿色、质地致密的愈伤组织,说明在愈伤组织的诱导中 2,4-D 起重要作用,支持了王跃华等<sup>[9]</sup>的研究结果。该研究进一步在 6-BA 1 mg · L<sup>-1</sup> 的基础上,添加不同浓度的 2,4-D,发现随着 2,4-D 浓度的增加,愈伤组织的诱导率总体上有增加,但愈伤组织的质地越发疏松,而优质愈伤组织所占的比例开始降低。然而,该研究同时也发现,无论基本培养基是 MS 或 1/2MS,最佳诱导培养基中愈伤诱导率均在 85% 以上,这一结果均优于石云平等<sup>[10]</sup>的研究,且 6-BA 与 2,4-D 浓度比为 1:1 时,MS 培养基中能诱导出高质量的优质愈伤组织且诱导率、黄绿色愈伤组织所占的比率相对较高,愈伤组织较为疏松;而 6-BA 与 2,4-D 浓度比为 1:2 时,1/2MS 培养基能诱导出高质量的优质愈伤组织,且诱导率、黄绿色愈伤组织所占的比

率相对较高,且质地疏松。

该研究发现,低浓度的 2,4-D 能够促进愈伤组织的增殖,而高浓度的 2,4-D 可使愈伤组织的增殖倍数降低甚至褐化死亡。石云平等<sup>[10]</sup>的研究结果表明,在愈伤组织增殖阶段,6-BA 与 2,4-D 浓度比为 1:3 时愈伤组织的增殖倍数最大,而该研究则认为 MS + 6-BA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2 mg · L<sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g · L<sup>-1</sup> + 琼脂 7 g · L<sup>-1</sup> 为白及增殖的最佳培养基,增殖倍数能够高达 7.457 倍,且愈伤组织为淡黄绿色、生长旺盛,但当 2,4-D 浓度超过 3 mg · L<sup>-1</sup> 时,愈伤组织的增殖倍数降低且出现褐化死亡。因此,较高浓度的 2,4-D (>3 mg · L<sup>-1</sup>) 不一定能使白及愈伤组织增殖,反而可能会使其增殖倍数降低,甚至使愈伤组织褐化死亡。

激素在植物脱分化的过程中起着重要作用,不同种类、不同浓度的激素组合对愈伤组织的诱导和继代培养结果不同。该研究发现,在最佳增殖培养基中添加 NAA 不能使愈伤组织分化,单独添加 2,4-D 比单独添加

6-BA 的愈伤组织分化率高,即 MS+2,4-D 2 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g · L<sup>-1</sup> + 琼脂 7 g · L<sup>-1</sup> 中的分化率最高,为 86.67%,这与王镭等<sup>[11]</sup>的研究结果“在愈伤组织分化阶段,必须降低或不添加 2,4-D 等生长素类物质,才有利于胚状体的形成与发育“不完全一致,其原因有待进一步探索。另外,该研究还发现在增殖培养基中添加一定浓度的 TDZ 可以促使愈伤组织分化。通过该研究可为基因转化和化学诱导获得新品种以及改良白及品种,为提高其产量和品质奠定基础,同时也为植物细胞悬浮培养生产次生代谢产物提供愈伤细胞诱导的试验依据。

### 参考文献

- [1] SINGH A, DUGGAL S. Medicinal orchids-an overview[J]. Ethnobotanical Leaflets, 2009(13): 399-412.
- [2] ZHONG Y. Integrative and discovery of conventional drugs[M]// ALAOUI-JAMALI M. Alternative and complementary therapies for cancer. New York: Springer US, 2010: 105-133.
- [3] JIANG F S, LI W P, HUANG Y F, et al. Antioxidant, antityrosinase and antitumor activity comparison: The potential utilization of fibrous root part of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e58004.
- [4] DIAO H, LI X, CHEN J, et al. *Bletilla striata* polysaccharide stimulates inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression in macrophages[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(2): 85-89.
- [5] 赵艳霞, 邓雁如, 张晓静, 等. 白及属药用植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(8): 1137-1145.
- [6] 陆峻波, 刘亚辉, 杨永红, 等. 从文献分析看我国白芨研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2011, 26(2): 288-292.
- [7] 林伊利, 李伟平, 马丹丹, 等. 白及组织快繁的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 336-339.
- [8] 韦卡娅, 刘燕琴, 秦静, 等. 白及组培外植体的筛选研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10(5): 13-14.
- [9] 王跃华, 段茂华, 任三军, 等. 山葵愈伤组织的诱导与增殖研究[J]. 江西农业科学, 2015, 43(1): 53-54.
- [10] 石云平, 赵志国, 唐凤鸾, 等. 白芨愈伤组织诱导、增殖与分化研究[J]. 中草药, 2013, 44(3): 349-353.
- [11] 王镭, 宋家祥, 付群英. 药用植物决明的愈伤组织诱导与生长增殖的培养条件研究[J]. 中草药, 1997, 12(12): 739-742.

## Effect of Different Hormone Combinations on the Induction, Proliferation and Differentiation of Callus in *Bletilla striata*

XU Delin<sup>1</sup>, SHEN Fang<sup>2</sup>, QIAN Gang<sup>1</sup>, QIAO Xiaoying<sup>2</sup>, CHU Shirun<sup>2</sup>, LI Lin<sup>1</sup>

(1. Department of Cell Biology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000; 2. The First Clinical Institute, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000)

**Abstract:** *Bletilla striata* (Thunb.) Rechb. f. was used in this study to screen the optimal mediums in callus induction, proliferation and differentiation through the comparisons of different hormones combined with the concentrations based on the medium of MS and 1/2MS. The results showed that the highest inducing rate was observed as 89.89% at the combination of MS+6-BA 1 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 3 mg · L<sup>-1</sup>. 6-BA (6-Benzylaminopurine) alone in the basic medium exhibited disability in producing the callus, while this disability was determined by adding 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) simultaneously. And the inducing rate increased as more 2,4-D was added, while the products quality decreased as the increasing of 2,4-D in the basic medium. Additionally, the combination of MS+6-BA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2 mg · L<sup>-1</sup> exhibited the highest proliferation rate (745.7%) than the other combinations after 30 days incubation. Increasing callus differentiation rate was observed as the increasing of NAA (alpha-Naphthylacetic acid) and TDZ (thidiazuron) in the basic medium, while NAA alone possessed better effect than TDZ. And the combination of MS+2,4-D 2 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 1 mg · L<sup>-1</sup> exhibited the highest differentiation rate (86.67%) than other combinations after 30 days differentiation.

**Keywords:** *Bletilla striata*; callus; induction; proliferation; differentiation; medium