

烈香杜鹃的离体培养和高效植株再生

顾地周*, 陆爽, 巴春影, 李媛媛

通化师范学院生物系, 吉林通化134002

摘要: 以烈香杜鹃嫩茎为外植体, 应用均匀设计法筛选其最适合的嫩茎基部直接再生芽苗和生根培养基。结果表明, 最适合烈香杜鹃嫩茎基部直接再生芽苗的诱导培养基为DR+2.30 mg·L⁻¹ TDZ+0.05 mg·L⁻¹ IAA+1.80 mg·L⁻¹ KT, 诱导率为99.6%; 生根培养基为1/2DR+0.07 mg·L⁻¹ IAA+0.02 mg·L⁻¹ NAA, 生根率达99.7%以上。以再生植株茎节为材料进行快速繁殖, 在35 d的培养周期内, 每段增殖倍数平均达5以上。

关键词: 烈香杜鹃; 离体培养; 植株再生; 均匀设计

In vitro Culture and Efficient Plantlet Regeneration of *Rhododendron anthopogonoides* Maxim.

GU Di-Zhou*, LU Shuang, BA Chun-Ying, LI Yuan-Yuan

Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002, China

Abstract: The tender stems of *Rhododendron anthopogonoides* were used as explants in the experiment, the uniform design was used to screen the most suitable media for shoots regeneration by the tender stems and rooting. The results showed that the best medium for shoots regeneration was DR+2.30 mg·L⁻¹ TDZ+0.05 mg·L⁻¹ IAA+1.80 mg·L⁻¹ KT, the rate of induction was 99.6%; the best medium for rooting was 1/2DR+0.07 mg·L⁻¹ IAA+0.02 mg·L⁻¹ NAA, the rate of rooting was 99.7%. Each stems with one node were cut from regenerated shoots and cultured for propagation, and proliferation rate achieved an average of 5 within 35 days.

Key words: *Rhododendron anthopogonoides*; *in vitro* culture; plantlet regeneration; uniform design

烈香杜鹃又名小叶枇杷、白香柴、黄花杜鹃, 为杜鹃花科杜鹃花属常绿灌木, 主要分布我国甘肃、青海及四川等地的高山坡、山地林下和灌丛中。烈香杜鹃具有清热解毒、止咳平喘、健胃消肿等功效, “烈香杜鹃片”为批准的全国推广用药(1971年), 西北高原生物研究所研制的“烈香杜鹃油”用于临床, 显效快, 优于其他的祛痰止咳药, 通过药理筛选及临床验证(中国药科大学1993; 兰州医学院药理病理教研室1974)。另外, 烈香杜鹃是优良的、有待研究开发的园艺观赏植物, 属高山杜鹃, 是杜鹃育种的重要种质资源。烈香杜鹃利用种子、扦插、嫁接及压条的常规繁殖存在萌发率、生根率和移栽成活率极低等问题, 使其开发及利用受到极大限制。目前, 关于烈香杜鹃的研究大多集中在化学成分和生药等方面(张继等2003; 胡浩斌等2004; 戴胜军等2004; 戴胜军和于德泉2005; 李维卫等2004; 张莉和袁永生2010), 而种苗繁殖和引种栽培的研究极少(曹文侠等2004; 那林香2010), 与其同属的其他种植物的离体培养

研究已有报道(汤桂钧等2004; 顾地周等2009a, b, d)。而本研究利用植物组织培养方法, 以烈香杜鹃嫩茎为材料, 在嫩茎基部直接诱导芽苗并形成丛生芽的方式建立了烈香杜鹃离体培养和高效植株再生体系, 在国内外尚未见报道。

材料与方法

1 外植体材料的来源与处理

烈香杜鹃(*Rhododendron anthopogonoides* Maxim.)枝条采自甘肃省兰州市兴隆山, 将枝条茎尖剪除后在实验室内水培, 促其叶腋休眠芽萌发。待休眠芽萌发长至2.00 cm后将嫩枝剪下, 在超净工作台上用75%酒精涮洗8 s, 再用5.0%次氯酸钙溶液浸泡15 min, 无菌水冲洗8次, 无菌滤纸吸干表面水分后备用。

收稿 2011-12-20 修定 2012-02-19

资助 吉林省科技厅项目(200705C05)。

* 通讯作者(E-mail: gudizhou@163.com; Tel: 0435-3208073)。

2 烈香杜鹃嫩茎基部直接再生芽苗的诱导

以DR为培养基(曹孜义和刘国民2002),将嫩枝切割成一叶一段,接种到培养基 $1/4DR+0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}+2.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ GA}_3$ 中,在试管内进行腋芽诱导和伸长生长培养(培养条件为温度 $26\text{ }^\circ\text{C}$ 、光照强度 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照周期 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$)。待腋芽长至 1.00 cm 时切下并切割成段,转接到附加不同浓度的噻重氮苯基脲(thidiazuron, TDZ)(由预试验确定为 $1.40\sim 2.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)(由预试验确定为 $0.06\sim 0.09\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和激动素(kinetin, KT)(由预试验确定为 $1.10\sim 1.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),加入蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $6.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,调节pH值为5.8,在温度 $(28\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$ 、光照强度 $22\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照周期 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 条件下培养。采用均匀设计法(顾地周等2009c),选用 $U_{12}(12^3)$ 均匀表,每个处理接种嫩茎数为10个,重复3次取平均值,筛选直接再生芽苗的TDZ、IAA和KT浓度配比。腋芽嫩茎培养40 d统计诱导率。

3 烈香杜鹃再生芽苗的生根培养

以 $1/2DR$ 为培养基,并附加不同浓度的IAA(由预试验确定为 $0.10\sim 0.16\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、吲哚丁酸(indolebutyric acid, IBA)(由预试验确定为 $0.08\sim 0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)(由预试验确定为 $0.04\sim 0.06\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂,调节pH为5.8,再生芽苗在温度 $(23\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$ 、光照强度 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照周期 $10\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 条件下培养。为了提高烈香杜鹃的生根率,选用 $U_{12}(12^3)$ 均匀表,每个处理接种再生芽苗数为10个,重复3次取平均值,筛选最适合生根的IAA、IBA和NAA浓度配比。再生芽苗培养30 d统计生根率。

采取节增殖方式对烈香杜鹃进行高效快繁(顾地周等2008a, b),待生根的苗伸长至 3.50 cm 以上时,在超净工作台上打开培养瓶,将生根的苗留一或二叶剪下苗干,并切割成一叶一段转接到附加 $2.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 赤霉素(gibberellic acid, GA_3)的生根培养基中,进行腋芽萌发伸长同时生根培养,统计并计算每瓶中每段茎节的增殖倍数和周期。

再生芽苗生根后,从培养瓶中取出再生植株,在含有 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 高锰酸钾溶液中洗去根部残留的琼脂,然后植入经200倍液的杀毒矾消毒过的草炭

土、河砂和腐烂松针(3:1:2)的混合基质中,用透光好的塑料薄膜覆盖以保湿保温,相对湿度保持在75%,温度控制在 $(24\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$,每天自然光照13 h,每天中午适当通风换气,每天早晚喷洒清水各1次。

4 数据处理与分析

通过均匀设计法进行试验设计,数据经分析处理后摸索出各因素对再生芽苗诱导率和再生芽苗生根率的影响。均匀设计软件采用Uniform Design 3.0V。

实验结果

1 烈香杜鹃嫩茎基部直接再生芽苗诱导培养基的筛选

由表1可得回归方程 $Y=42.9+22.7X_1-303X_2+14.7X_3$,样本容量 $N=12$,显著性水平 $\alpha=0.05$,经计算,复相关系数 $R=0.9729$,剩余标准差 $s=2.36$,检验值 $F_t=47.26$,临界值 $F_{(0.05,3,8)}=4.066$, $F_t>F_{(0.05,3,8)}$,表明回归方程显著。检验各方程项的显著性可知,TDZ、IAA和KT均对诱导率影响显著,其最优浓度分别为 2.10 、 0.06 和 $1.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,并计算出诱导率的最优解析解为96.0%,需按公式 $Y=y\pm u_\alpha\times s$ (其中 u_α 为正态分布的双侧分位数, s 为剩余标准差)计算出优化值估计区间为90.56%~101.44%。表1和回归分析结果可知,TDZ、IBA和KT对回归的贡献率分别为20.3%、9.41%和9.64%,说明TDZ对再生芽苗的诱

表1 烈香杜鹃再生芽苗诱导培养基的 $U_{12}(12^3)$ 均匀设计试验

Table 1 $U_{12}(12^3)$ uniform design test of media for bud seedling regeneration of *R. anthopogonoides*

编号	TDZ浓度 (X_1)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	IAA浓度 (X_2)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	KT浓度 (X_3)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	诱导率 (Y)/%
1	1.40	0.08	1.30	71.0
2	1.50	0.09	1.60	74.4
3	1.60	0.09	1.40	68.7
4	1.70	0.08	1.10	73.5
5	1.80	0.09	1.20	75.9
6	1.90	0.07	1.50	84.1
7	2.00	0.08	1.50	89.0
8	2.10	0.06	1.20	91.2
9	1.80	0.07	1.10	78.5
10	1.90	0.06	1.40	88.7
11	2.00	0.06	1.60	94.6
12	2.10	0.07	1.30	86.3

导率的贡献大于IAA和KT。因TDZ和KT均与诱导率呈正相关, IAA与诱导率呈负相关, 推测TDZ和KT浓度分别高于 $2.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及IAA浓度低于 $0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 有较高的芽苗诱导率。

进一步以TDZ ($2.10\sim 2.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+IAA ($0\sim 0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)以及TDZ ($2.10\sim 2.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+KT ($1.60\sim 2.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)分别做了7个水平的2因素补充试验(由3种激素贡献率确定因素配对), 选用 U_7 (7^2)均匀表, 每个处理接种嫩茎数为10个, 重复3次取平均值。结果表明, 当 $\text{TDZ}>2.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{IAA}<0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 再生芽苗诱导率均低于89.0%; 而 $\text{TDZ}>2.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{KT}<1.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 再生芽苗诱导率均低于92.0%。

将嫩枝切割成一叶一段接种到培养基1/4DR+

$0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+ $2.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃中, 在试管内进行腋芽萌发生长和伸长培养。待腋芽在培养瓶中长至1.00 cm时切下(图1-A), 并切割成段转接到培养基DR+ $2.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+ $1.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT上进行验证试验, 重复3次取诱导率的平均值。嫩茎培养10 d, 发现嫩茎基部切口处产生大量颗粒状小凸起; 22 d后颗粒状小凸起逐渐转变为锥状; 培养至35 d, 锥状体逐渐生长并伸长为不定芽形成丛生芽团(图1-B); 继续培养至50 d, 可产生大量不定芽且长度可达1.80 cm以上(图1-C), 诱导率达99.6%, 均高于表1中12个处理的诱导率, 且在估计区间范围内。可见, 烈香杜鹃嫩茎基部直接再生芽苗诱导的最佳培养基为DR+ $2.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ+ $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA+ $1.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT。

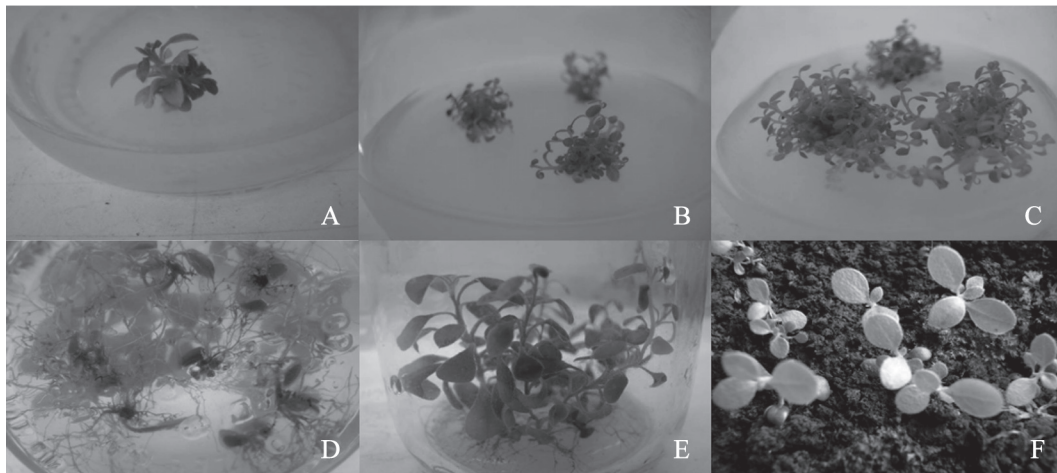


图1 烈香杜鹃离体培养和高效植株再生的各阶段

Fig. 1 *In vitro* culture and efficient plantlet regeneration of *R. anthopogonoides* at various stages
A: 嫩枝段腋芽萌发生长; B、C: 嫩茎基部直接再生芽苗诱导; D、E: 再生芽苗生根和高效快繁; F: 移栽。

2 烈香杜鹃再生芽苗生根培养基的筛选

表2中实验所得数据经分析处理后, 得回归方程可得回归方程 $Y=139-290X_1-429X_3$, 样本容量 $N=12$, 显著性水平 $\alpha=0.05$, 经计算, 复相关系数 $R=0.9124$, 剩余标准差 $s=3.31$, 检验值 $F_T=22.36$, 临界值 $F_{(0.05,2,9)}=4.256$, $F_T>F_{(0.05,2,9)}$, 回归方程显著。检验IAA、IBA和NAA的显著性可知, IAA和NAA两个因素对生根率影响显著, 而IBA对生根率影响不显著, IAA和NAA的最优浓度分别为 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 以此组合计算最优解析解为92.8%, 计算得优化值估计区间为85.31%~100.29%。通过回

归分析可知, IAA和NAA对回归的贡献率分别为70.0%和30.0%, 表明IAA对再生芽苗生根率的贡献大于NAA。因IAA和NAA均与生根率呈负相关, 推测IAA和NAA浓度分别在 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下, 可获得较高的生根率。

又以 $0\sim 0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA以及 $0\sim 0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA做了11个水平的补充试验, 选用 U_{11} (11^2)均匀表, 每个处理接种芽苗数为10个, 重复3次取平均值, 结果表明, 当 $\text{IAA}>0.07 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{NAA}<0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 芽苗生根率平均值均低于87.4%。

待诱导的再生芽苗长至2.00 cm左右时, 在无

表2 烈香杜鹃再生芽苗生根培养基的 U_{12} (12^3)均匀设计试验Table 2 U_{12} (12^3) uniform design test of media for shoots rooting of *R. anthopogonoides*

编号	IAA浓度 (X_1)/mg·L ⁻¹	IBA浓度 (X_2)/mg·L ⁻¹	NAA浓度 (X_3)/mg·L ⁻¹	生根率 (Y)/%
1	0.10	0.08	0.04	91.1
2	0.11	0.10	0.04	90.5
3	0.12	0.09	0.06	80.0
4	0.13	0.09	0.06	77.6
5	0.14	0.10	0.05	78.6
6	0.15	0.08	0.05	70.0
7	0.16	0.10	0.05	73.9
8	0.12	0.10	0.05	84.0
9	0.13	0.09	0.06	77.6
10	0.14	0.09	0.06	66.2
11	0.15	0.08	0.04	75.8
12	0.16	0.08	0.04	78.3

菌条件下打开培养瓶,将生长健壮的芽苗从芽团上切下,转接到培养基1/2DR+0.07 mg·L⁻¹ IAA+0.02mg·L⁻¹ NAA的中培养生根,重复3次取平均值。再生芽苗培养10 d,芽苗基部切口处产生微小锥状颗粒;培养18 d后锥状颗粒逐渐转变为白色的根锥;培养至28 d根锥伸长为不定根;35 d后可形成7条以上含有大量侧根的不定根(图1-D),生根率达99.7%。数值在估计区间范围内,且比表2所列12个水平的生根率均高。可见,烈香杜鹃再生芽苗生根的最佳培养基为1/2DR+0.07 mg·L⁻¹ IAA+0.02 mg·L⁻¹ NAA。

采取节增殖方式,将含有单叶的茎节在培养基1/2DR+0.07 mg·L⁻¹ IAA+0.02 mg·L⁻¹ NAA+2.00 mg·L⁻¹ GA₃上培养38 d,腋芽逐渐萌发伸长生长,同时在切口处和枝干部可长出6~8条不定根,苗高可达4.0 cm(图1-E)。经过35 d的培养后,每节段平均增殖5倍以上。

待芽苗生根后并长至3.00 cm以上时进行移栽炼苗,15 d可揭去薄膜,成活率达95.0%以上(图1-F)。

讨 论

本实验结果表明,培养基DR+2.30 mg·L⁻¹ TDZ+0.05 mg·L⁻¹ IAA+1.80 mg·L⁻¹ KT对烈香杜鹃嫩茎直接再生芽苗的诱导效果最佳,TDZ浓度低于1.40 mg·L⁻¹和高于2.30 mg·L⁻¹时嫩茎基部芽苗诱导

率均低于54.0%,说明烈香杜鹃嫩茎直接再生芽苗需要适宜浓度的TDZ。由预实验和试验结果表明,适宜浓度的IAA有利于芽苗的迅速生长。再生芽苗诱导培养基中添加适当浓度(1.80 mg·L⁻¹)的KT有利于促进嫩茎直接再生芽苗的速度和提高再生芽苗的诱导率(李合生2002),说明了植物器官的发生发育对不同植物生长调节物质都具有不同程度的选择性(高新一和王玉英2003)。这可能是由植物自身的基因型控制的,而不同基因型又决定了细胞分化和器官重建所依赖的植物生长调节物质种类及其浓度高低有所不同;在添加0.07 mg·L⁻¹ IAA和0.02 mg·L⁻¹ NAA的1/2DR培养基中进行烈香杜鹃再生芽苗的生根培养,生根速度快,平均生根率高达99.7%。烈香杜鹃再生芽苗生根需要2种生长素才能达到显著生根效果,但2种生长素需要适当的配比。当IAA和NAA浓度较低时,再生芽苗生根率较低,不足45.0%;当生长素浓度较高时,再生芽苗基部膨胀并产生愈伤组织,继续培养从愈伤组织上产生根,含有这样根的苗在炼苗移栽时,根随愈伤组织从苗基部脱落,成活率极低,这可能是根中和苗茎的疏导组织连接错位导致的。Donnelly等(1985)的研究也发现了这一缺点。高效快繁采取再生植株茎节增殖的方式,在生根培养基中附加2.00 mg·L⁻¹的GA₃有利于腋芽快速萌发和生长,从而缩短了茎节的增殖周期,提高了增殖倍数。王雯雯等(2009)开展的大字杜鹃快繁研究也报道了该方法。该方法成本低,简捷而可操作性强,可用于工厂化育苗。

目前,国外有许多野生杜鹃优良品种已引种驯化并通过人工繁殖成为栽培种。我国野生杜鹃品种众多,但人工繁殖并开发利用极少。烈香杜鹃是我国珍贵的野生药用和园艺观赏植物资源,至今未见推广应用。本结果建立了烈香杜鹃嫩茎基部直接再生芽苗和高效植株再生体系,为烈香杜鹃和其它野生杜鹃优良品种的开发利用和工厂化育苗提供了基础和方法。

参考文献

- 曹文侠,张德罡,胡自治(2004). 4种高寒杜鹃对跨海拔梯度移栽的生态适应性. 甘肃农业大学学报, 39 (1): 42~44
曹致义,刘国民(2002). 实用植物组织培养技术教程. 兰州: 甘肃科学技术出版社
戴胜军,陈若芸,于德泉(2004). 烈香杜鹃中的黄酮类成分研究. 中

- 国中药杂志, 28 (1): 44~47
- 戴胜军, 于德泉(2005). 烈香杜鹃中的三萜类化合物. 中国天然药物, 3 (6): 347~349
- 高新一, 王玉英(2003). 植物无性繁殖实用技术. 北京: 金盾出版社
- 顾地周, 丛小力, 姜云天, 何晓燕(2008a). 色木槭的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 44 (2): 314
- 顾地周, 丛小力, 宋利丽, 王艳萍, 姜云天(2008b). 木通马兜铃的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 44 (1): 136
- 顾地周, 邓志刚, 綦茂伟, 曹逊, 朱俊义, 姜云天(2009a). 苞叶杜鹃离体培养及种质试管保存体系的建立. 南京林业大学学报(自然科学版), 33 (3): 20~24
- 顾地周, 高捍东, 郭玉昕, 曹逊, 朱俊义, 姜云天(2009b). 毛毡杜鹃离体培养及种质试管保存体系的建立. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 37 (4): 151~157
- 顾地周, 罗微, 曹逊, 姜云天, 朱俊义(2009c). 松毛翠的离体快繁体系建立及种质试管保存研究. 林业科学, 45 (7): 140~144
- 顾地周, 张琪, 朱俊义(2009d). 小叶杜鹃的离体快繁体系建立及种质试管的保存. 东北林业大学学报, 37 (10): 26~28
- 胡浩斌, 郑尚珍, 黄彬弟, 宋志军, 沈序维(2004). 烈香杜鹃挥发油的化学成分. 兰州医学院学报, 30 (3): 31~33
- 兰州医学院药理病理教研室(1974). 小叶枇杷素的药理研究及毒性观察. 中华医学杂志, 54 (5): 279
- 李合生(2002). 现代植物生理学. 北京: 高等教育出版社
- 李维卫, 胡凤祖, 师治贤(2004). 烈香杜鹃叶挥发油有效成分的研究. 云南大学学报(自然科学版), 26 (1): 48~51
- 那林香(2010). 青海几种野生杜鹃花引种方法初探. 吉林农业, (7): 116~117
- 汤桂钧, 张建安, 蒋建平, 胡海峰, 何正其(2004). 高山杜鹃的组织培养快速繁殖技术研究. 上海农业学报, 20 (3): 15~18
- 王雯雯, 马秋月, 朱俊义, 顾地周(2009). 大字杜鹃离体快繁体系建立及种质试管保存研究. 植物研究, 29 (2): 198~203
- 张莉, 袁永生(2010). 高效液相色谱法测定烈香杜鹃油滴丸中苯基丙酮含量. 中国实验方剂学杂志, 16 (10): 86~88
- 张继, 马君义, 杨永利, 姚健, 黄爱仑, 高黎明, 赵文杰(2003). 烈香杜鹃挥发性成分的分析研究. 中草药, 34 (4): 304~305
- 中国药科大学(1993). 中药辞海(第1卷). 北京: 中国医药科技出版社, 404
- Donnelly DJ, Vidaver WE, Lee KY (1985). The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell Tiss Org Cult, (1): 43~50