

柴胡의 體細胞胚 形成과 再生 植物體의 RAPD 分析

박철호* · 유창연* · 서정식** · 김기식** · 안상득* · 장병호*

Induction of Somatic Embryos and RAPD Analysis in Regenerated Plantlets of *Bupleurum falcatum* L.

Cheol-Ho Park*, Chang-Yeon Yu*, Jeong-Sik Seo**, Ki-Sik Kim**, Sang-Duek Ahn* and Byoung-Ho Chang*

ABSTRACT : This study was conducted to determine the optimum conditions for induction and differentiation of somatic embryos as well as germination of encapsulated and stored somatic embryos.

Somatic embryos was better formed in 1/2X MS medium than full - strength MS medium. 0.1 to 1.0mg/1BA and kinetin promoted shoot differentiation of somatic embryos. Higher concentration tend to inhibit differentiation. IAA affect positively both root and shoot growth. In vitro germination of somatic embryos encapsulated with 2% alginate matrix containing 1/2 MS nutrient medium and AgNO₃ 5mg/l was 86 %. Storage of somatic embryos was effective at 5°C but the germination rate decreased with longer storage period.

RAPD analyses with plants regenerated from the somatic embryos showed DNA polymorphism, indicating abolition of primer binding site by point mutation, deletion, or insertion of certain sequences.

시호(*Bupleurum falcatum* L.)는 산형과의 다년초로서 우리나라의 거의 전역에서 자생하며 뿌리를 해열, 진통, 해독 및 소염등의 처방에 사용하는 약용식물이다. 시호의 이용은 한때 주로 야생채취에 의존하여 왔으며 국내수급 및 대일수출의 증대로 수요가 증대함에 따라 재배가 본격화 되었다. 그러나 농촌의 노동력 부족과 인건비 상승에 따른 채취 물량의 감소와 불량한 중국산 시호의 무분별한 반입으로 말미암아 우량한 시호의 안정적 공급 및 수출 기반의 확립이 위협받고 있는 실정이다.

시호는 유전, 발육, 형태 및 saponin함량 등에 있

어서 지리적 변이가 발견되고 동일 산지 내에서도 대폭적인 개체의 변이가 발견되며⁴⁾ 근부병과 초기 생육 부진등 재배의 문제점도 많은 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

이와 같은 문제점을 개선하기 위한 한가지 방안으로서 시호에서도 최근 식물개량 및 번식의 여러 분야에서 적용되고 있는 조직배양기술을 통하여 양질의 시호를 단시일내에 대량증식하기 위한 부정배의 형성 및 분화에 대한 연구^(6,7,9,10,12,13)는 물론 약⁽¹⁵⁾ 및 원형질체의 배양^(3,17), 조직배양 根으로부터 함량이 증가된 saikosaponin의 추출^(3,7) 등이 보고되었다.

본 연구는 1993년도 과학기술처 선도기술개발사업 연구비에 의해서 수행된 결과의 일부분임.

* 江原大學校 農科大學(College of Agriculture, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

** 江原道 農村振興院 (Kangwon Provincial RDA, Chuncheon 200-150 Korea) <95. 1. 18. 接受>

그러나 체세포배 발생을 통한 번식기술에 있어서 체세포배 형성율 및 동조성에 변이가 크고 체세포배의 기내 및 포장에서의 발아와 발근이 미약하며 체세포배의 보호, 파종, 저장 등 인공종자 제조기술이 확립되어 있지 않다.

따라서 본 연구는 우선 체세포배의 발생과 이용 기술을 개발하고 나아가 배양계(培養系)를 이용한 우량계통의 생산을 목적으로 배양식물의 유전적 변이 여부를 조사한 결과이다.

재료 및 방법

체세포배의 발생 및 기관분화

시호종자를 발아시켜 화분에서 성장한 어린잎을 절단하여 70% 에탄올에 침지후 5% sodium hypochlorite로 살균한 다음 멸균수로 3회 세척하여 치상하였다. 캘러스 유기배지로는 MS배지에 30g/L sucrose와 한천 8g/L를 첨가한 고체배지를 사용하였으며 NAA와 Thidiazuron의 농도를 달리하여 조합처리하였다.

pH는 5.8로 조절하였으며 고압멸균기에 15분간 멸균하였다. 배양조건은 형광등으로 24시간 조명(2000 Lux)하면서 25°C로 조절한 배양실에 배양하였다. 고체배지에서 유기된 배발생 캘러스를 잘게 부수어 60 mesh에 통과시켜 현탁배양의 시료로 사용하였으며 100mL flask의 액체배지 20mL에 시료 3mL씩을 가하여 진탕배양기에서 배양하였고 매 7~10일마다 계대배양하였다. 체세포배 발생에 대한 배지의 효과를 알아보기 위하여 MS, B5, LS, White 등 네 종류의 액체배지로 현탁배양하였으며 무기염류농도 1/8×, 1/4×, 1/2×, 1×, 2×로 하였다. 교반속도는 100rpm으로 하였고, 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 1000Lux, 24시간의 광조건과 25°C에서 배양하였다.

현탁배양에서 형성된 체세포배를 식물 성장조절제를 첨가하지 않은 MS기본배지와 BA, kinetin을 각각 0.1, 0.5, 1.0mg/L 처리한 MS기본배지(agar 0.8%, sucrose 3%)에 치상하여 6주동안 배양하였다. 분화된 싹에서 뿌리를 유도하기 위하여 shoot를 3cm길이로 절단한 것을 IAA, IBA 및 NAA를 0, 0.5 및 1.0mg/L로 첨가한 MS기본배지(3% sucrose, 0.8% agar)에 치상하였다. 25°C의 온도와 1000 Lux의 24시간 광조건에서 배양하였다.

체세포배의 보호 및 저장

1/2농도의 MS기본배지에 AgNO₃ 0, 1, 5, 10, 20mg/L를 처리한 2.0%의 알진산용액을 만들어 여기에 5~6mm의 성숙한 체세포배를 넣고 피펫으로 0.2ml씩 꺼내어 50mM CaCl₂용액에 떨어뜨린 다음 10분간 반응시켜 알진산 캡슐을 씌웠다. 피복된 체세포배를 멸균수로 2회 세척한 후 발아실험을 수행하였다. 발아실험은 식물생장조절제가 첨가되지 않은 기내의 MS배지와 멸균된 버미규라이트가 든 petridish에 체세포배를 직접 파종하여 1000Lux, 24시간 연속조명과 25°C에서 배양하여 2주 후에 식물체 형성율을 조사하였다.

현탁배양에서 형성된 체세포배를 식물 성장조절제를 첨가하지 않은 MS기본배지에 치상하여 5, 10, 25°C 냉장고에 0, 30, 60, 90일 동안 저장하였다. 저장 후 25°C의 MS기본배지에서 발아율을 조사하였다.

체세포배 배양식물의 RAPD 분석

체세포배 배양식물의 유전적 변이 여부를 탐색하기 위하여 임의 선발한 18개체의 잎(약 3cm)을 액체질소로 얼린 후 잘 마쇄하여 400 μL extraction buffer(200mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)를 첨가한 다음 약 5분간 교반하였다. 한시간 경과 후 4°C에서 13,000rpm 10분간 원심분리하여 300 μL의 상등액을 새 tube에 옮기고 300 μL의 chloroform을 첨가하여 20분간 잘 혼합한 후 다시 10,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 250 μL의 상등액을 취하여 새 시험관에 옮기고 250 μL의 차가운(-20°C) isopropanol을 첨가하여 냉동고에 약 한시간 보존하였다. 다시 4°C에서 10,000rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 시험관 하층에 있는 pellet을 20분간 건조시켰다. 200 μL의 멸균증류수를 첨가하여 64°C에 30분간 유지시키며 DNA를 증류수에 녹이고 5,000rpm으로 약 25초간 quick-spin한 후 상등액을 다시 새 시험관에 옮겨 냉장고에 보관하면서 분석재료로 사용하였다.

DNA증폭은 1×buffer(10mM KCl, 10mM Tris HCl, pH 8.3), 4mM dNTP, 4mM MgCl₂, 2units amplitag DNA polymerase stoeffel fragment(Perkin Elmer), 0.2 μM primer(10mer) 및 50mg DNA가 혼합된 25 μL의 반응혼합물에 18 μL의 mineral oil을

첨가하여 Perkin Elmer DNA Thermal cycler에서 94°C 1분, 35°C 1분, 72°C 2분, 45cycle을 반복한 후 72°C에서 10분 더 유지시켜 수행하였다. 반응이 끝난 후 반응생성물 25 μ L위에 3 μ L의 DNA tracking dye solution을 첨가한 후 이중 18 μ L를 취하여 ethidium bromide가 첨가된 1.5% agarose gel(1 \times TAE buffer<0.04M Tris-Acetate, 0.001M EDTA>에 agarose를 녹였다)에 loading하여 증폭된 DNA를 분리하였다. 전기영동은 150V로 약 4시간 정도 하였으며 전기영동후 UV box위에서 증폭된 DNA를 관찰하였다. 여섯가지 primer를 이용하여 genomic DNA의 polymorphic amplified DNA를 확인하였다. 사용된 여섯가지 primer는 다음과 같다.

- A(322): ACA GGG AAC G,
 B(347):TTG CTT GGC G,
 C(346): TAG GCG AAC G,
 D(350): TGA CGC GCT C,
 E(349): GGA GCC CCC T,
 F(331): GCC TAG TCA C

결과 및 고찰

체세포배의 발생 및 기관분화

배발생 캘러스를 배지별로 처리하여 4주간 현탁 배양한 결과 MS배지가 체세포 배형성에 가장 효과적이었다고 LS배지는 MS배지에 비하면 효율이 다소 낮았으며 B5, White배지는 체세포배 형성에 적합하지 않았다(표 1). 표 2에서 보는 바와 같이 MS기본 배지보다 농도를 반으로 줄인 1/2 MS배지가 체세포배형성에 가장 효과적인 것으로 나타나 이전의 보고와 일치하였다¹²⁾. 1/4 MS배지는 1/2 MS배지보

Table 1. Effect of basal media on somatic embryo development in suspension culture of *Bupleurum falcatum* calli after 4 weeks.

Basal media	Stages of somatic embryo development			
	Globular (\pm SE)	Heart (\pm SE)	Torpedo (\pm SE)	Cotyledoned (\pm SE)
B5(Gamborg et al)	29 \pm 9	8 \pm 3	7 \pm 3	6 \pm 2
LS(Linsmaier - Skoog)	31 \pm 8	15 \pm 6	12 \pm 4	12 \pm 4
MS(Murashige - Skoog)	35 \pm 11	18 \pm 9	16 \pm 7	15 \pm 5
White	26 \pm 7	7 \pm 2	5 \pm 1	5 \pm 1

Table 2. Effect of strength of MS medium on somatic embryo development in suspension culture of *B. falcatum* calli after 4 weeks.

Basal media	Stages of somatic embryo development			
	Globular (\pm SE)	Heart (\pm SE)	Torpedo (\pm SE)	Cotyledon (\pm SE)
2 MS	39 \pm 13	15 \pm 7	5 \pm 2	7 \pm 3
1 MS	35 \pm 11	18 \pm 9	16 \pm 7	15 \pm 5
1/2 MS	29 \pm 9	18 \pm 8	15 \pm 6	21 \pm 9
1/4 MS	22 \pm 7	19 \pm 6	18 \pm 9	17 \pm 5
1/8 MS	37 \pm 14	13 \pm 5	-	-

다 체세포형성이 저조하였으나 MS기본배지 보다는 체세포배 형성이 양호하였으며 2 MS와 1/8 MS배지에서는 체세포배의 발육이 현저히 억제되었다.

李 등¹⁰⁾은 0.25~4mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 치상후 20일에서 30일 내에 치상 유엽조직으로부터 체세포배의 형성을 관찰하여 직접적인 체세포배발생(Direct Somatic Embryogenesis)를 보고하였다. 金 등⁹⁾은 2~3mg/L kinetin 첨가배지에서 현탁배양과 globular 체세포배의 형성이 양호하였고 또한 glutamine과 활성탄의 사용이 체세포배의 형성에 효과적임을 보고하였으며 hormone free MS배지에서 균일한 배를 대량생산 하였다.

표 3은 cytokinin류를 처리한 배지에 현탁배양에서 형성된 체세포배를 6주간 배양하여 shoot형성을 관찰한 결과이다. BA와 kinetin 모두 0.1mg/L에서 shoot형성이 양호하였고, 농도가 높을수록 억제되는 경향을 보였다. 이와같은 결과는 저농도(0.1~1.0mg/L)의 BA, NAA등의 호르몬을 첨가한 배지에 시호의 캘러스 또는 체세포배로부터 효과적으로 식물체를 재분화한 이전의 보고^{10,12,15)}와 유사한 반면 호르

Table 3. Effect of cytokinins on shoot formation from somatic embryos in *B. falcatum* after 6 weeks.

Growth regulators (mg/L)	Shoot formation (%)	Mean no. of shoots per test tube(\pm SE)	Shoot length (cm \pm SE)	
				BA
	1.0	65	1.4 \pm 0.3	3.1 \pm 0.8
	2.0	45	1.2 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3
Kinetin	0.5	85	2.3 \pm 0.8	6.1 \pm 2.3
	1.0	60	1.4 \pm 0.4	2.8 \pm 0.8
	2.0	55	1.5 \pm 0.5	1.1 \pm 0.3

Table 4. Effect of auxin on rooting of shoots of *B. falcatum* after 3 weeks.

Conc. (mg/L)	No. roots/shoot	Root	Shoot
Control	4.9±1.1	2.5±0.5	5.8±1.0
IAA 0.5	14.2±2.9	1.9±0.4	9.1±0.9
1	11.8±3.4	1.3±0.5	6.8±1.1
IBA 0.5	7.3±1.5	0.9±0.2	4.7±0.8
1	8.8±2.1	1.4±0.3	3.8±0.6
NAA 0.5	15.1±3.5	1.8±0.6	4.2±0.8
1	12.5±2.6	2.0±0.5	2.3±0.3

몬을 첨가하지 않고 sucrose의 농도를 감소시킨(1%) 1/2 LS배지 또는 B5배지에서 부정배로 부터 양호한 식물체를 재분화한 平岡 등⁶⁾과 大野 등¹⁾의 결과와는 다소 차이를 보였다.

Shoot의 뿌리 발육을 촉진시키기 위하여 옥신류를 처리한 결과를 표 4에서 보면 대조구에 비하여 옥신류 처리는 발근에 효과가 있었다. Shoot당 발근수는 옥신류에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 근장은 NAA 처리에서 길어진 반면 shoot의 신장은 억제되었다. IBA는 shoot당 발근수와 근장에서 IAA와 큰 차이는 없었으나 shoot 신장이 IAA경우보다 억제되었다. 따라서 shoot의 발근과 신장을 위해서는 IAA가 비교적 효과적임을 알 수 있다. 또한 사용한 세가지 옥신류의 1.0mg/L 처리에서는 모두 치상한 줄기 기부에서 캘러스가 형성되었으므로 건전한 묘 생산을 위해서는 저농도의 IAA와 IBA가 효과적임을 알았다.

체세포배의 보호 및 저장

1/2농도의 MS기본배지에 AgNO₃ 0, 1, 5, 10, 20 mg/L를 처리한 2.0%의 알진산용액을 만들어 여기에 5~6mm의 성숙한 체세포배를 넣고 피켓으로 0.2ml 씩 꺼내어 50mM CaCl₂ 용액에 떨어뜨린 다음 10분간 반응시켜 알진산 캡슐을 씌워 피복한 체세포배를 기내에서 MS배지에 발아시킨 결과, 표 3과 같이 식물체형성(전환율)은 AgNO₃ 5mg/L 처리가 86%로 가장 양호하였으며(Fig. 1), 10mg/L 이상처리에서는 식물체 형성이 억제되었다. 비미큐라이트에 피복한 피복체세포배의 식물체 전환율은 3~20%로 대체로 저조하였으며 AgNO₃ 5mg/L처리에서 가장 양호하였다(표 5). 이것은 같은 방법으로 두릅나무의 체세포배를 피복하여 발아시킨 결과와 유사하였다¹⁴⁾.

Table 5. Effect of AgNO₃ added to encapsulation matrix on *in vitro* germination of somatic embryos after 5 weeks.

AgNO ₃ (mg/l.)	Medium	No. embryos encapsulated	No. plants formed	Plant formation(%)
0	M*	50	34	68
	V	50	2	4
1	M	50	38	76
	V	50	5	10
5	M	50	43	86
	V	50	10	20
10	M	50	21	42
	V	50	3	6
20	M	50	4	8
	V	40	1	3

*M : MS medium, V : vermiculite

Table 6. Survival rates of somatic embryos of *B. falcatum* after storage at 5, 10, and 25°C for different period.

Storage temp.	Duration of storage(days)	Survival rate (%)
5°C	30	95
	60	80
	90	65
10°C	30	90
	60	RE*
	90	RE
25°C	30	RE

RE* : Regeneration

체세포배를 이용한 종묘생산 기술은 근래에 Conifer류에서 성공적으로 발달하여 육림용으로 이용되고 있으나⁸⁾ 당근, 고구마, 미나리 등에서 보는 바와 같이 체세포배를 이용한 인공종자의 제조 및 이용을 실용화하기에는 아직 해결해야 할 많은 기술적 과제가 남아 있다. 본 연구에서도 체세포배로부터의 저조한 식물체 전환율을 개선할 수 있는 기술적 방안이 강구되어야 할 필요가 있다.

현탁배양에서 형성된 체세포배를 식물 생장조절제를 첨가하지 않은 MS기본배지에 치상하여 5, 10, 25°C 냉장고에 0, 30, 60, 90일 동안 저장하였다. 저장 후 25°C의 MS기본배지에서 발아율을 조사한 결과, 5°C에서 60%이상의 발아율을 나타내어 저장에 효과적이었으며 이는 천궁의 체세포배를 4°C에서 3개월 동안 저장한 후에 62%의 발아율을 나타낸 채등²⁾의 보고와 유사하였다(표 6).

그러나 30일 이후에는 저장기간이 길어질수록 발

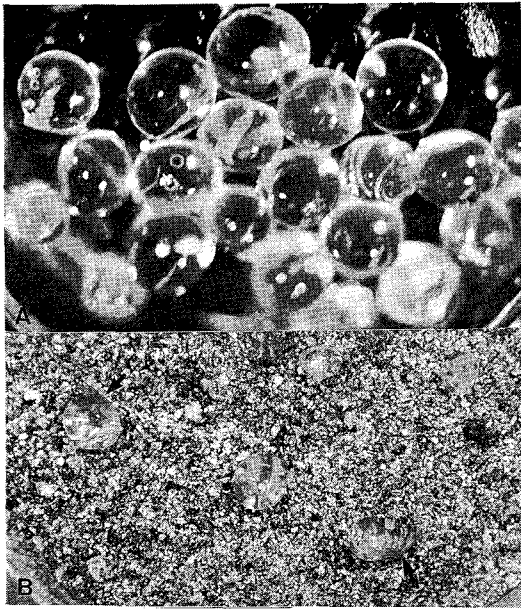


Fig. 1. Encapsulation(A) and germination (B, arrow) of somatic embryos of *B. falcatum*.

아율이 저하되었으며 10, 25℃저장에서는 30일 이후에 체세포배로부터 식물체가 재분화되어 저장효과

가 전혀 없었다.

체세포배 배양식물의 유전변이

임의 선발한 18개체에 대한 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)분석을 실시하여 major-band수준에서 DNA polymorphism을 확인한 결과 체세포배 배양 식물 가운데 primer에 따라 특정 band의 소실과 출현을 보임으로써 많은 DNA수준에서의 polymorphism이 관찰되었다(그림 2).

이것은 어떤 sequence의 점돌연변이나 결실 또는 삽입에 의한 primer binding site의 소실에 기인하는 것으로 보인다¹¹⁾. 그러나 체세포배 유래식물의 체세포 염색체의 검경결과 관찰한 32개체 모두 2n=20의 염색체수를 나타내 염색체수의 변이는 발견되지 않았다. 이것은 부정배 유도법으로 증식된 시호의 배양식물 가운데서 염색체의 수 또는 구조변이를 관찰한 天野 등¹⁾의 보고와는 상이한 결과이다. 이와같은 결과는 체세포배 배양식물의 세포유전학적인 안정으로 임성을 고도로 유지하면서 육종소재의 창출이 가능한 유전변이체의 획득이 기대된다는 점에서 의의가 있다.

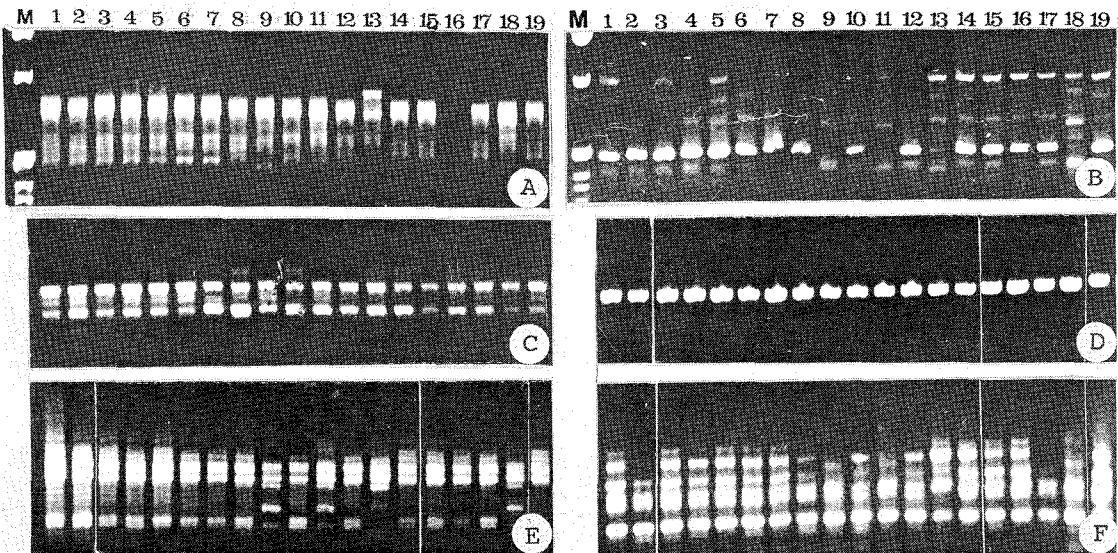


Fig. 2. Genetic variation in *B. falcatum* somaclones detected by the RAPD method. Lanes from 1 to 18 were somaclones and 19 was a seed-germinated plant (primers-A : 322, B : 347, C : 346, D : 350, E : 349, F : 331)

摘 要

체세포배의 생산, 보호 및 저장조건의 구명과 체세포배의 기내분화 및 체세포배 배양식물의 유전변이 여부를 탐색하기 위한 연구를 수행한 결과 MS 기본배지 보다 1/2MS배지가 체세포배형성에 가장 효과적이었으며 BA, kinetin처리 모두 0.1~1mg/L에서 체세포배가 많아하여 식물체 형성이 양호하였고 농도가 높을수록 억제되는 경향을 보였으며 shoot의 발근과 신장을 위해서는 IAA처리가 효과적이었다. 1/2MS기본배지에 2.0%의 알진산 용액으로 알진산캡슐을 씌운 체세포배의 기내에서의 식물체형성(전환율)은 AgNO₃ 5mg/l처리가 86%로 가장 양호하였다. 5℃에서 3개월 동안 체세포배를 저온저장하여 65%의 발아가 이루어졌으며 저장기간이 길어질수록 발아율이 저하되었다.

체세포배 배양식물은 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)분석을 통하여 여러 major band 수준에서 DNA polymorphism이 관찰되었다.

引用 文 獻

1. 天野明美, 藤本賢治, 大橋裕, 松永一成, 水上元, 1989. 不定胚誘導法によって 増殖されたミシマサイコ 再分化植物個體における 染色体數 變異, 生藥學雜誌 43(1) : 13~18
2. 채영압, 박주현, 송지숙, 윤상원, 오은하, 유희숙, 1994. 천궁현탁배양에서 체세포배형성과 저장연구, 한육지 26권 별책1호 : 122~123
3. 조필형, 성낙선, 배계화, 소웅영, 조덕이 1990. 조직배양한 시호근의 saikosaponin 함량, 생약학회지. 21(3) : 205~209
4. 정성현, 1993. 염색체 전기영동과 RAPD를 이용한 시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 유전적 계통분석, 충남대학교 석사학위논문 : 61
5. 정성현, 인동수, 방재욱, 1994. 시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 원형질체 배양을 통한 식물체의 재분화, 한국약용작물학회 발표요지 : 42
6. 平岡昇, 鉦知了, 富田裕, 1983. 組織培養による ミシマサイコの 繁殖, 生藥學雜誌, 37(1) : 62~67

7. Hiraoka N. T. Kodama, M. Oyangi, S. Nakano, Y. Tomita, N. Yamada, O. Iida, M. Satake. 1986. Characteristics of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. Plant Cell Reports 5 : 319~321
8. 고갑천, 1994. 체세포배를 이용한 인공종자 개발과 종묘생산, 농촌진흥청 첨단기술농업정보 : 29~32
9. 김태수, 박문수, 박호기, 장영선, 박근용, 김재훈, 1992. 시호(*Bupleurum falcatum* L.)의 현탁배양 세포로부터 체세포배 유도 및 식물체 재분화, 한국육종학회 발표요지 : 17~18
10. Lee S. Y., T. S. Kim, H. S. Kim, Y. T. Lee, 1988 Somatic emsryogenesis of *Bupleurum falcatum* L. I. Effects of growth regulator, glutamine and activated charcoal. Korean J. Breed. 20 : 191~198
11. Lee, Y. S., C. H. Park, K. Y. Kang, N. S. Kim. 1994. RAPD analyses using rapidly extracted genomic DNAs in plant species. Korean J. Breed. 26(3) : 287~293
12. 박철호, 유창연, 김동욱, 서정식, 안상득, 장병호. 1994. 시호의 뿌리 현탁 배양에서 직접 체세포배발생 및 식물체재분화, 한육지 26(1) : 41~45
13. 박철호, 유창연, 김동욱, 조혜경, 박경숙, 서정식, 안상득, 장병호. 1994. 시호의 체세포 조직배양에 의한 식물체재분화, 약작지 2(1) : 60~66
14. 박철호, 이운수, 김남수, 신영범, 1994. 두릅나무 피복체세포배의 기내발아. 동양자원식물학회지 7(2) : 133~135
15. 박충현, 성낙술, 이승택, 정해근. 1994. 시호(*Bupleurum falcatum* L.) 약배양에서의 callus형성과 식물체재분화. 한국육종학회지 26권 별책1호 417~418
16. 서형수, 1993. 시호 '밀양1호' 국내선발재배기술 확립, 연구와 지도 34(2) : 39~41
17. Xia G., Z. Li, G. Guo, H. Chen. 1992. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Bupleurum scorzoniferifolium* Willd. Plant Cell Reports 11 : 155~158