

둥근잎평의비름(*Sedum rotundifolium* D. Lee)의 식물체 재분화에 미치는 식물생장조절제의 영향

권혜경 · 윤의수

Effect of plant growth regulators on plant regeneration from the *Sedum rotundifolium* D. Lee

Hye-Kyoung Kwon · Eui-Soo Yoon

Received: 12 March 2010 / Accepted: 26 March 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To establish the system of *In vitro* plant regeneration, the floral bud and leaf explants of *Sedum rotundifolium* were cultured on the MS media supplemented with different concentration of 2,4-D, NAA, and BA. The callus induction was more effective in the floral explants than the leaf explants, and was the best on MS medium containing 1.0 or 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA. The highest numbers of shoots were regenerated when callus were cultured on MS medium containing 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA for 8 weeks. The normal root formation from shoot was effective on the MS medium containing IAA alone. The regenerated plantlets were transferred to the pot and acclimatized successfully.

서 론

둥근잎평의비름 (*Sedum rotundifolium* D. Lee)은 돌나물과에 속하는 다년생 초본식물로서 경상북도 청송군 주왕산 계곡의 바위틈에만 분포하고 있으며, 둥근잎평의비름이라고도 한다. 둥근잎평의비름의 초장이 15~25 cm 정도이고 잎은 원형 또는 타원형으로 가장자리가 불규칙하고 둔한 톱니모양이다. 특히, 7~8월경에 짙은 자홍색의 꽃이 피는데 관상용으로 이용가치가 높아 화훼작물로서의 개발 가치가 높다. 또한 어린 순은 식용으로 이용되고 있

고, 한방에서는 식물 전체를 대하증이나 선혈 등의 약재로 사용하고 있다. 전세계적으로 우리나라에만 자생하고 있는 둥근잎평의비름은 관상용과 약재용으로 무분별한 채취와 자생지의 훼손으로 개체수가 감소되어 환경부가 지정한 멸종위기 식물 II급에 속하는 식물로 매우 귀중한 유전자원이다. 그러나 둥근잎평의비름은 자연상태에서 개화기가 짧고, 개화 종료 후 지하부는 월동을 위한 휴면아가 생성되고 지상부는 고사하므로 개체의 번식 혹은 대량 재배에 어려움이 많다 (Jeong 1999; Kwon and Jeong 1999).

자연상태에서 휴면기를 갖는 둥근잎평의비름의 안정적인 주년생산체제를 마련하기 위하여, 화아분화와 개화 조절에 관한 연구결과가 보고된 바 있다. 장·단일식물인 둥근잎평의비름은 휴면의 타파에 저온보다 일장조건이 깊이 관여하며 (Jeong 1999) 한계일장인 14시간 이상의 일장에서는 화아분화가 일어나고 14시간 이하의 일장에서는 화아발달이 된다 (Jeong 2001). 또한 화아는 21일 이상의 장일처리에서만 형성되며 정상적인 생장을 하여 개화가 된다 (Jeong and Kwon 2003). 그러나 화아분화와 발달 및 개화조절을 통한 둥근잎평의비름의 생산은 단시간 내에 안정적으로 대량생산하는데 어려움이 있다.

식물의 조직배양은 멸종위기 종 식물의 번식 수단으로 이용이 가능하며 국내에서도 조직배양의 방법을 통하여 몇 종의 희귀종에 대한 현지의 보존을 위한 연구 결과가 발표된 바 있다 (Moon et al. 1997, 1999; Yoon 1997). 돌나물과 식물에서 조직배양을 통한 연구는 평의비름의 잎과 줄기 절편 (Yoon 1997)과 돌나물의 옆절편 (Ahn and Lee 2004)으로부터 식물체 재분화에 관련한 연구 이외에는 전무한 실정이다.

H.-K. Kwon · E.-S. Yoon (✉)
공주대학교 자연과학대학 생명과학과
(Department of Biology, Colleges of nature sciences, Kongju National University, Kongju 314-701, Republic of Korea)
e-mail: yes@kongju.ac.kr

따라서, 본 연구는 멸종 위기에 처한 둥근잎쟁의비름의 보존과 증식을 위하여, 기내 식물체 재분화 체계를 확립하고자 캘러스 형성과 식물체 재분화에 미치는 성장조절물질의 영향을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용한 둥근잎쟁의비름 (*Sedum rotundifolium*)은 자생지에서 수집하여 공주대학교 온실에서 재배하여 공시하였다. 3~5 mm 정도 자란 발달 초기의 화뢰와 5~7 번째 잎을 채취하여 흐르는 물에 수세한 후, 70% Ethanol에 30초간 표면소독하고 1% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 살균하여 멸균수로 5회 세척하였다.

캘러스 유도

성장조절제의 종류에 따른 캘러스 형성을 조사하기 위하여, MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 오옥신류의 1.0, 2.0, 3.0 mg/L 2,4-D와 1.0, 2.0 mg/L NAA, 그리고 사이토키닌류인 0.1, 1.0 mg/L BA의 단독처리와 이들 농도의 2,4-D와 NAA를 BA와 혼합처리한 18종의 배지를 이용하였다. 화뢰는 세로로 2등분하여 절단면이 배지에 닿도록 접종하였고, 잎은 5×5 mm 크기로 잘라 앞면이 위쪽이 되도록 접종하였다. 배양조건은 25±2°C에서 50 μmol·l⁻²·sec⁻¹ 광도 (16시간 광주기)로 조절되는 배양실에서 배양하였다. 캘러스의 유도율은 절편을 각 배지에 접종하고 4주 후에 캘러스가 유도된 화뢰와 잎의 수를 조사하여 전체 치상 수에 대한 백분율로 나타내었다.

식물체 재분화

유도된 캘러스를 MS 기본고체배지에 1.0, 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0, 2.0 mg/L NAA, 1.0, 2.0 mg/L IAA, 1.0 mg/L BA의 단독처리와 이들의 혼합처리 한 10종의 배지를 조제하여 각 절편 유래 캘러스의 증식 및 재분화 식물체를 유도하였다. 4주 간격으로 계대배양하면서 각 배지에서 8주간 배양한 후에 캘러스로부터 유도된 싹과 뿌리 수를 조사하였다. 배양조건은 25±2°C에서 50 μmol·l⁻²·sec⁻¹ 광도 (16시간 광주기)로 조절되는 배양실에서 배양하였다. 재분화된 식물체는 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에 옮겨 배양 후 버미큐라이트와 펄라이트를 2 : 1로 혼합한 인공배양토로 채운 화분에 이식하였다.

결과 및 고찰

캘러스 형성에 미치는 성장조절물질의 영향

둥근잎쟁의비름 (*Sedum rotundifolium*)의 캘러스 형성에 미치는 성장조절물질의 영향을 구명하기 위하여, 화뢰와 잎 절편체를 2,4-D와 NAA를 BA와 혼합조제 한 MS 배지에 치상하여 캘러스 분화양상을 조사한 결과, 절편체에 따라서 캘러스의 분화시기에 차이를 보였다. 화뢰 절편체는 배양 1주일 후부터 화경을 비롯하여 화뢰 전체가 팽대해지기 시작하여 2주일 후에는 짙은 녹색의 축축하고 부드러운 캘러스가 형성되었으나 (Fig. 1A), 잎 절편체의 경우에는 치상된 절편체의 절단면이 배양 10일 후부터 팽대되기 시작하여 30일경에는 잎 절편체의 절단면으로부터 부스러지기 쉬운 캘러스를 형성하였다 (Fig. 1B). 또한 잎 절편체의 경우 화뢰 절편체에 비하여 전체적으로 캘러스의 유도율이 높았다. 참시호의 경우에서도 잎과 화뢰의 유조직에서 캘러스의 유도가 잘 되었으나, 유엽에서 65%로 화뢰의 44%보다 양호하였다 (Park et al. 1994).

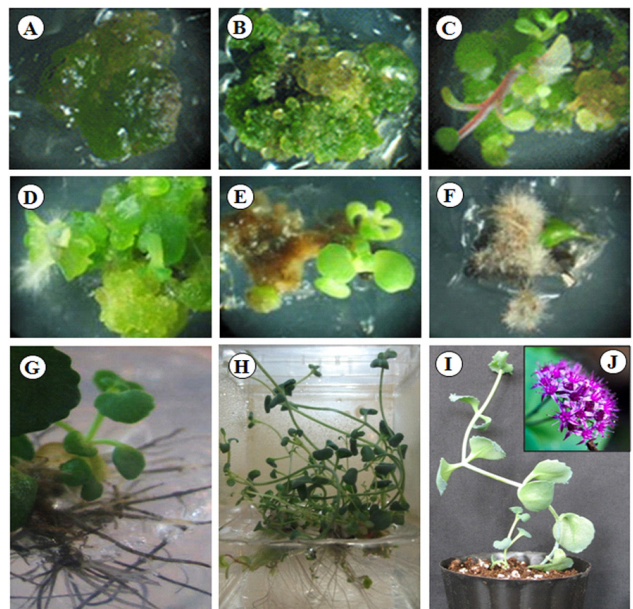


Fig. 1 Callus induction and plant regeneration from floral bud and leaf explants of *Sedum rotundifolium*. Callus were induced from floral bud (A) and leaf explants (B) on the medium containing 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA. Adventitious buds were induced from explants cultured on the medium containing 1.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA (C). Induced callus were cultured on the medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA (D), 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA (E), 1.0 mg/L NAA (F), and 1.0 mg/L IAA (G), respectively. Regenerated plantlet cultured on hormone-free MS medium for 2 weeks (H). Acclimatization of regenerated plantlets (I). Flowering of regenerated plantlets transferred to soil (J)

Table 1 Effect of growth regulators on the callus induction and callus growth from floral bud and leaf explants of *Sedum rotundifolium* after 4 weeks of culture

Growth regulators ^x (mg/L)			Callus induction ^y (%)		Callus growth ^z	Callus color
2,4-D	NAA	BA	Floral bud	Leaf		
0.0	0.0	0.0	0.0 n	0.0 n	-	-
0.0		0.1	0.0 n	0.0 n	-	-
0.0		1.0	12.2 m	0.0 n	-	-
1.0		0.0	12.4 m	0.0 n	-	-
1.0		0.1	16.3 l	30.1 i	+	Green
1.0		1.0	50.0 e	40.1 f	++	Green
2.0		0.0	0.0 n	0.0 n	-	-
2.0		0.1	40.0 f	70.0 d	++	Light green
2.0		1.0	40.0 f	90.0 b	+++	Green
3.0		0.0	0.0 n	0.0 n	-	-
3.0		0.1	35.3 g	70.1 d	±	Yellow green
3.0		1.0	25.0 j	80.1 c	±	Green
	1.0	0.0	80.1 c	0.0 n	±	Yellow green
	1.0	0.1	20.1 k	30.1 i	+	Light green
	1.0	1.0	100.0 a	100.0 a	+++	Light green
	2.0	0.0	36.1 g	0.0 n	±	Yellow green
	2.0	0.1	32.0 g	40.1 f	+	Yellow green
	2.0	1.0	70.1 d	100.0 a	+++	Green

^x Growth regulators were supplemented to MS basal medium.

^y Mean separation within columns for callus induction by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

^z -, not detected, ±; poor, +; slight, ++; moderate, +++; good

화뢰와 잎 절편체 모두에서 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에서는 캘러스가 유도되지 않았고, 2,4-D, NAA, BA의 단독처리 한 배지에서도 캘러스의 형성이 거의 일어나지 않았다 (Table 1). 오옥신류의 2,4-D와 NAA를 단독처리 한 배지에서는 화뢰 절편체에서만 캘러스의 분화없이 솜털을 많이 갖는 부정근의 발생이 보였다. 2,4-D와 BA를 혼합첨가 한 배지에서 화뢰 절편체로부터 캘러스 형성률은 대체로 낮았으며, 캘러스의 증식은 매우 저조하였다. 특히, 1.0 ~ 2.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA를 혼합첨가 한 배지에서는 화뢰 절편체로부터 부정아의 발생이 보였으며 부정아의 빠른 성장을 보였다 (Fig. 1C). 한편 잎 절편체에서는 2.0 mg/L 이상의 2,4-D와 BA를 혼합첨가 한 배지에서는 70% 이상의 높은 캘러스의 형성률을 보였으나, 3.0 mg/L 2,4-D에 BA를 혼합한 배지에서 형성된 캘러스는 점차 연한 녹색을 띄며 캘러스의 형성 이후의 증식은 매우 느렸다. NAA를 첨가한 배지에서는 2,4-D를 첨가한 배지보다 캘러스 형성률이 대체적으로 높았으며, NAA와 BA를 혼합처리 한 배지에서는 화뢰와 잎 절편체 모두에서 캘러스 형성에 효과적이었다. 특히, 1.0 ~ 2.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼합첨가 배지에서는

캘러스의 형성률이 100%로 가장 높았으며, 캘러스의 증식 또한 매우 왕성하였다. 참깨에서도 하배축과 자엽 절편체로부터 NAA와 BA 혼합첨가 배지에서는 캘러스의 형성이 양호하였으나 2,4-D와 BA 혼합첨가 배지에서는 저조하였다 (Kim 2004). 또한 지황의 잎 절편체에서도 NAA와 BA 혼합첨가 배지에서 높은 캘러스 유도율을 보였다 (Chae and Park 1993). 한편 둥근잎평의비름과 같은 *Sedum*속 식물인 평의비름에서는 2.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA 혼합배지에서 잎의 절편으로부터 100%의 캘러스가 형성되었으며 (Yoon 1997), 돌나물에서는 3.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA 혼합배지에서 가장 높은 캘러스 형성률을 보였다 (Ahn and Lee 2004). 오옥신과 사이토키닌은 절편체의 탈분화 및 분화에 있어 필수적인 요소이며 (Chen et al. 1985) 동일 속이라 할지라도 배양에 이용되는 조직 절편체의 종류 및 첨가되는 식물생장조절제의 농도에 따라 캘러스 형성 양상이 크게 다르다 (Ryu et al. 1992). 이와 같이 같은 *Sedum*속 식물에서도 식물생장조절제에 대한 캘러스 형성 반응이 다른 것은 식물종에 따라서 내생호르몬의 종류 및 함량의 차이가 있기 때문인 것으로 생각된다.

식물체 재분화에 미치는 성장조절물질의 영향

등근잎평의비름의 재분화체를 획득하기 위하여 화뢰와 잎 절편체로부터 유도된 캘러스와 부정근을 2,4-D, NAA, IAA를 BA와 혼합처리 한 14종의 MS 배지에 치상하여 신초와 뿌리의 형성률을 조사하였다. 부정근이 형성되지 않은 캘러스를 생장호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지로 계대배양 하였을 때에는 더 이상의 캘러스 생장이나 신초의 유도가 나타나지 않았으며 갈변 현상을 보였다 (Table 2). 식물생장호르몬의 단독처리구에서는 신초의 형성이 관찰되지 않았으나, 2,4-D, NAA, IAA의 오옥신류에 BA를 혼합처리 한 경우에는 신초의 형성이 관찰되었다. 특히, 2.0 mg/L 2,4-D에 1.0 mg/L BA를 혼합처리 한 배지에서 8주간 배양하였을 때 가장 많은 신초가 유도되었으며 (Fig. 1D), 1.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼합배지에서는 캘러스가 갈변되면서 신초가 유도되었다 (Fig. 1E). NAA를 단독처리 한 배지로 계대한 캘러스에서는 가늘고 흰 부정근만 배양 2주 후부터 관찰되었으며 (Fig. 1F), 신초는 유도되지 않았다. IAA 단독처리구에서는 캘러스가 녹색에서 노란색으로 변하고, 신초의 형성이 관찰되지 않았다. 2,4-D와 BA의 혼합처리구에서는 신초의 형성과 동시에 부정근의 유도가 관찰되었으며 (Fig. 1D), 이때 유도된 부정근은 정상적인 뿌리로 발달되었다. Kim 등 (2007)은 섬시호에서도 캘러스를 통한 신초의 재분화가 2.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA의 혼합배지에서 가

장 높았고, 절편체당 재분화된 신초수도 가장 많았다고 보고하였다. 그러나 같은 돌나물과에 속하는 평의비름에서는 2,4-D와 BA 혼합배지에서 부정근이 유도되었으며, NAA와 BA 혼합배지에서 부정근의 형성이 왕성하였다 (Yoon 1997). 식물의 조직배양을 통한 재분화의 효율은 주로 배지에 첨가된 식물생장조절제와 식물체 자체에 함유하고 있는 내생 물질의 조성 및 균형, 절편체의 분화능, 식물종의 genotype에 의해 결정되며 이들은 같은 속 혹은 동일 종에서도 품종에 따라 상당한 차이를 보인다 (Koroch et al. 2002, Ryu et al. 1992). 본 연구결과에서 등근잎평의비름으로부터 유도된 캘러스에서 신초의 재분화 효율을 높이는 데 오옥신류보다 사이토카닌류의 BA가 보다 더 결정적인 역할을 하는 것으로 보인다. Kang 등 (1998)은 글라디올러스 캘러스로부터 신초가 재분화 될 때 오옥신의 종류에 상관없이 외생 사이토카닌이 요구되나 고농도를 필요로 하지 않는다고 하였으며, 사이토카닌류 중에서도 BA가 신초 분화에 가장 효과적이라고 보고하였다 (Bae et al. 2001, Gulati and Jaiwal 1992).

재분화된 신초를 절단하여 2,4-D, NAA, IAA와 BA를 혼합처리 한 MS 배지로 계대하여 뿌리의 유도율을 조사하였다. 발근은 오옥신류와 BA를 혼합처리 한 배지에서 보다 오옥신류의 단독처리구에서 훨씬 양호하였다 (Table 2). 특히, 1.0 mg/L IAA 단독처리구에서 발근률은 92.4%로 가장 높았다 (Fig. 1G). 1.0 mg/L NAA의 단독처리구에서도 73.3%의 높은 발근률을 보였으나 IAA 단독처리구에

Table 2 Effects of plant regulators on shoot and root induction of derived callus from floral bud and leaf explants after 8 weeks of culture

Growth regulators (mg/L)				Shoot induction ^x (%)	Root induction ^y (%)
2,4-D	NAA	IAA	BA		
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 e	0.0 g
0.0			1.0	0.0 e	0.0 g
1.0			0.0	0.0 e	30.0 e
1.0			1.0	33.7 b	31.2 e
2.0			0.0	0.0 e	30.0 e
2.0			1.0	48.3 a	29.0 e
	1.0		0.0	0.0 e	73.3 c
	1.0		1.0	16.1 c	18.1 f
	2.0		0.0	0.0 e	46.7 d
	2.0		1.0	0.0 e	0.0 g
		1.0	0.0	0.0 e	92.4 a
		1.0	1.0	11.1 d	0.0 g
		2.0	0.0	0.0 e	75.4 b
		2.0	1.0	0.0 e	0.0 g

^x Mean separation within columns for shoot induction by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

^y Mean separation within columns for root induction by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

서 보다 더 정상적이며 성장이 양호한 뿌리의 분화가 관찰되었다. Yoon (1997)은 NAA와 IAA 단독처리에서 썩의 비름 신태로부터 발근이 양호하며, NAA 보다는 IAA 단독처리구에서 더 정상적인 뿌리 분화를 얻을 수 있었다고 보고하였다.

재분화된 식물체는 순화처리를 위해서 생장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에 옮겨 2주간 배양하였다 (Fig. 1H). 버미큐라이트와 펄라이트를 2 : 1로 혼합한 인공토양으로 이식하여 재분화체의 생존율을 관찰한 결과 100%의 생존율을 나타냈으며, 정상적인 식물체로 성장하였다 (Fig. 1I). 또한 온실에서 토양 순화과정을 거쳐 순화처리에 의해 정상적인 꽃이 개화하였다 (Fig. 1J).

적 요

둥근잎썩의비름 (*Sedum rotundifolium* D. Lee)의 기내 식물체 재분화 체계를 확립하기 위하여, 생장조절물질을 다르게 조합한 MS 배지에 화뢰와 잎 절편체를 치상하여 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하였다. 캘러스 유기는 화뢰절편체에서 보다 잎절편체에서 왕성하게 관찰되었으며, 1.0 ~ 2.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA의 혼합첨가 배지에서는 캘러스의 형성률이 100%로 가장 높았으며, 캘러스의 증식도 매우 왕성하였다. 또한, 2.0 mg/L 2,4-D에 1.0 mg/L BA를 혼합처리 한 배지에서 유도된 캘러스를 치상하여 8주간 배양하였을 때 가장 많은 신태가 유도되었고, IAA를 단독처리 한 MS 배지에서 보다 더 정상적이며 성장이 양호한 뿌리의 분화가 관찰되었다. 재분화 식물체는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지로 계대배양하여 성장시킨 후 인공토양의 화분으로 옮겨 관찰한 결과 100%의 생존율을 보이며 정상적으로 생육하여 재분화 식물체를 대량으로 획득하였다.

사 사

이 논문은 2009년도 공주대학교 학술연구 지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

인용문헌

Ahn JH, Lee SY (2004) Effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Sedum sarmentosum*. Kor J Plant Biotechnol 31:25-29
 Bae CH, Tohyama K, Lee SC, Lim YP, Kim HI, Song PS, Lee HY (2001) Efficient plant regeneration using mature seed-derived

callus in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). Kor J Plant Tissue Cult 28:61-67
 Chae YA, Park SU (1993) Callus induction and somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa*. Kor J Med Crop Sci 1:184-190
 Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultures inflorescence of *Oryza sativa* L.. Plant Cell Tissue Organ Cult 21:111-117
 Gulati A, Jaiwal PK (1992) In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Plant Cell Tissue Organ Cult 29:199-205
 Jeong JH (1999) Growth and flowering response of potted *Sedum rotundifolium* to low temperature, photoperiod and GA₃. J Kor Soc Hort Sci 40: 761-764
 Jeong JH (2001) Critical daylength for flower bud formation and development of *Sedum rotundifolium*. J Basic and Life Res Sci 1:219-222
 Jeong JH, Kwon ST (2003) Induction daylength period for flower bud formation and development of *Sedum rotundifolium*. J Kor Flower Res Soc 11:225-228
 Kang MS, Choi JD, Kim KW (1998) Effects of culture conditions on adventitious bud formation from callus of *Gladiolus 'Topaz'*. J Kor Soc Hort Sci 39:338-342
 Kim HY, Cho HJ, Kim EY, Kim MY, Park HB (2007) Mass propagation by in vitro culture of *Bupleurum latissimum* Nakai. Kor J Plant Res 20:367-374
 Kim YH (2001) Effects of BA, NAA, 2,4-D and AgNO₃ treatments on the callus induction and shoot regeneration from hypocotyls and cotyledon of Sesame (*Sesamum indicum* L.). J Kor Soc Hort Sci 42:70-74
 Koroch A, Juliani HR, Kapteyn J, Simon JE (2002) In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. Plant Cell Tissue Organ Cult 69:79-83
 Kwon ST, Jeong JH (1999) Genetic relationship among *Sedum* species based on morphological characteristics and RAPD analysis. Kor J Hort Sci Technol 17:490-493
 Moon HK, Suk GY, Kim SC (1997) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatilis* N. through tissue culture. J Kor For Soc 86:430-434
 Moon HK, Suk GY, Kwon YJ, Son SH (1999) Micropropagation of a rare species, *Abeliophyllum distichum* Nakai. via axillary bud culture. Kor J Plant Tissue Cult 26:133-136
 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:487-497
 Park CH, Yu CY, Kim DW, Cho HK, Park KS, Seo JS, Ahn SD, Chang BH (1994) Plant regeneration of *Bupleurum spp.* through somatic tissue culture. Kor J Med Crop Sci 2:60-66
 Ryu JH, Doo HS, Kwon TH (1992) Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.). Kor J Plant Tissue Cult 19:171-177
 Yoon ES (1997) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf and stem explants cultures of *Sedum erythrostichum* Miq. Kor J plant Tissue Cult 24:285-289