

주요 장미 7품종의 FISH 핵형분석

황윤정¹ · 한태호² · Cathie Martin³ · 임기병^{1*}

¹경북대학교 원예과학과, ²전남대학교 농업생명과학대학 식물생명과학부, ³영국 John Innes Centre

FISH Karyotype Analysis of Seven Rose Cultivars

Yoon-Jung Hwang¹, Tae Ho Han², Cathie Martin³, and Ki-Byung Lim^{1*}

¹Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Division of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Department of Metabolic Biology, John Innes Centre, Colney, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom

Abstract. Determination of ploidy level for the mother plant is prerequisite for effective breeding. The study was carried out to determine the ploidy level in 7 different plant materials by FISH karyotype analysis. Among the seven plant varieties analyzed, all exhibit tetraploid ($2n = 4x = 28$) based on the results observed in chromosome analysis. Four signals of 45S rDNAs were detected on the terminal region of the short arm of chromosome 7. The length of somatic metaphase chromosomes ranges from 1.67 to 2.67 μm in ‘Alexandra’, 1.40 to 2.04 μm in ‘Freud’, 1.64 to 2.24 in ‘Little Silver’, 1.69 to 2.26 μm in ‘Teresa’, 1.70 to 2.65 μm in ‘Tineke’, 1.35 to 2.08 μm in ‘Vital’, 1.39 to 2.04 μm in ‘Yellow Mimi’. Total length of the chromosome ranges from 11.23 μm in ‘Freud’ as minimum to 15.05 μm in ‘Alexandra’ as maximum. The karyotypes were composed of metacentric, submetacentric, and subtelocentric chromosome but there is no subtelocentric chromosome.

Additional key words: breeding, chromosome, cultivated rose, ploidy level, rDNA

서 언

장미속은 *Hulthemia*, *Eurosa*(*Rosa*), *Platyrhodon*, *Hesperhodon*의 4아속으로 구분되고, 이 중 *Eurosa* 아속은 다시 10절(section)로 나뉘어진다. 장미속 식물은 주로 북위 20도에서 70도 사이에 분포하며 남반부에는 자생하지 않는 것으로 알려져 있다(Jones and Luchsinger, 1987; Krüssmann, 1982). 장미는 기원전 2000년경부터 재배되기 시작하였으며, 오랜 기간에 걸쳐 다양한 속, 종으로 분화되어 현재 전 세계적으로 150여 원종이 분포하고 있다(Krüssmann, 1982). 우리나라에는 찰레(*Rosa multiflora*), 해당화(*R. rugosa*), 돌가시나무(*R. wichuraiana*) 등을 포함하여 12종의 장미속 식물이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다(Kim, 1996; Lee, 1996). 현재까지 알려진 장미 품종만도 25,000여 종으로 다양하다

(Ma et al., 1997). 국내에서는 국내 연구기관의 교배에 의하여 2000년 ‘핑크레이디’(Kim et al., 2001) 등 5품종을 육성하였으며 이후, ‘사브리나’(Kim et al., 2002), ‘스칼라’(Gi et al., 2004), ‘단미’(Gi et al., 2006) 등 약 70여종을 육성하였다.

장미의 기본 염색체 수는 7개이고 2배체($2n = 2x = 14$)부터 8배체($2n = 8x = 56$)까지 다양하게 구성된다(Darlington and Wylie, 1955). 대부분의 야생종은 2배체($2n = 2x = 14$)로, 정원용이나 절화용 장미 품종은 대체로 4배체($2n = 4x = 28$)으로 알려져 있으나 정확한 장미 염색체의 배수성에 대한 보고는 전무한 실정이다(Hwang et al., 2010). 또한 품종 육성을 위한 교배가 19세기 초부터 시작하여 이루어졌으나 다양한 배수성, 교잡으로 인한 복잡한 유전체 구성, 긴 세대주기, 낮은 발아율로 인해 교잡이나 돌연변이에 의한

*Corresponding author: kblim@knu.ac.kr

※ Received 30 May 2012; Revised 9 October 2012; Accepted 9 October 2012. 이 논문은 2010년도 정부재원(교육과학기술부 학술연구조성사업비)으로 한국연구재단의 지원을 받아 연구되었음(NRF-2010-013-F00003).

품종개발, 분류학 및 유전학 연구의 부족 등으로 장미 연구는 많은 어려움이 존재한다(Millan et al., 1996).

일부 장미 원종에 대하여 ribosomal DNA(rDNA)를 탐침으로 한 Fluorescence in situ hybridization(FISH) 핵형분석이 수행된 바 있으나(Fernández-Romero et al., 2001; Ma et al., 1997) 재배종 장미에 대한 핵형분석에 대한 정보는 전무한 실정이다. FISH 기법은 염색체 상에서 특정 DNA 서열 부위를 밝혀냄으로써 명확하게 염색체의 특성을 규명할 수 있는 기법으로 물리적 유전자 지도작성, 계통 구성분석, 유전자 사이의 거리 측정 등에 다양하게 응용될 수 있는 유용한 방법이다. 따라서 장미 원종 및 품종에 있어서의 FISH 핵형분석은 우수 품종의 세포유전학적 특성을 명확히 규명하고 후대를 분석하는데 도움을 줄 수 있다.

이에 본 연구는 ribosomal DNA를 탐침으로 이용한 FISH 기법을 통해 장미 7품종(‘알렉산드라’, ‘프로이트’, ‘리틀실버’, ‘테레사’, ‘티네케’, ‘비탈’, ‘엘로우미미’)의 핵형 분석을 통하여 배수성을 확인하고 장미속 식물의 세포 유전학적 연구의 토대를 마련하여 새로운 품종의 장미를 육성하는데 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

John Innes Centre 온실에서 재배된 장미 7품종(‘알렉산드라’, ‘프로이트’, ‘리틀실버’, ‘테레사’, ‘티네케’, ‘비탈’, ‘엘로우미미’)을 삼목하여 새로운 근단을 유도하였다.

염색체 표본 제작

새로이 유도된 2-3cm 정도 자란 뿌리를 채취하여 2mM 8-hydroxyquinoline 용액에서 16°C를 유지하면서 5-6시간 동안 암상태로 전처리한 후 Aceto-ethanol (glacial acetic acid : alcohol = 1:3 v/v) 용액에서 2시간 이상 고정하고 70% ethanol에서 저장하였다. 저장한 재료를 충분히 수세한 후 pectolyase 0.3%, cellulase 0.3%, cytohelicase 0.3% 및 150mM citrate buffer로 조성한 효소 혼합액에 넣어 37°C에서 1-2시간 처리하고, 60% acetic 용액을 적하하여 squash 방법으로 슬라이드 위에 전개하여 표본을 제작하였다.

FISH 핵형분석

제작된 표본에 RNase A용액(DNase-free, 100 μ L·mL⁻¹)를 적하하여 37°C의 humid chamber에서 1시간 동안 처리한 후, 2x SSC용액에서 수세하였다. 4% paraformaldehyde 용액에서 10분간 처리 후, 2x SSC 용액에 수세하고 70%,

90%, 100%의 알코올 처리하여 상온에서 건조하였다. Digoxigenin-11-dUTP로 표지된 50-100ng· μ L⁻¹ 탐침을 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2x SSC으로 조성된 탐침 혼합액에 첨가하여 70°C에서 10분간 변성시킨 후 5분간 급냉시켰다. 건조된 슬라이드에 100 μ L의 탐침 혼합액을 적하하여 커버글라스로 덮고 항온수조에서 5분간(80°C) 처리한 후, 37°C humid chamber에서 혼성화하였다. 혼성화가 끝난 슬라이드는 커버글라스 제거 후 2x SSC 용액과 0.1x SSC에서 수세 하였다. Digoxigenin의 검출을 위해 FITC conjugated anti-digoxigenin antibodies를 blocking buffer에 혼합하여 37°C에서 1시간 암반응시켰다. 슬라이드는 39°C의 detection 용액에서 3회 수세한 후, 70%, 90%, 100%의 알코올에서 수세하고 상온에서 건조하였다. 수세 후 건조된 슬라이드에 2 μ L·mL⁻¹의 DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole) 용액으로 대비 염색하고 vectashield로 mounting하여 커버슬라이드를 덮었다. 완성된 슬라이드는 형광현미경(fluorescence microscope BX 61, Nikon, Japan)을 이용하여 배율 X200, X400, X1000로 확대하며 염색체의 위치와 모양을 검경하였다. 염색체의 분석은 핵형 분석 시스템(Genus version 3.8 program, Applied Imaging Corporation, USA)이 장착된 CCD 카메라를 이용하여 분석하였다. 염색체의 길이는 품종 당 최소 5쌍의 중기 염색체를 Genus 프로그램상의 길이측정법 이용하여 평균값을 측정하였으며, 염색체의 번호는 각각의 염색체 길이를 측정하여 연속적인 길이의 감소함에 따라 부여하였다.

결과 및 고찰

염색체 조성

7종의 장미 재배종의 염색체 길이와 배수성을 분석하였으며 그 결과는 Table 1과 2에 나타내었다. 염색체의 길이의 분석 결과, ‘알렉산드라’는 1.67-2.67 μ m, ‘프로이트’는 1.40-2.04 μ m, ‘리틀실버’는 1.64-2.24 μ m, ‘테레사’는 1.69-2.26 μ m, ‘티네케’는 1.70-2.65 μ m, ‘비탈’은 1.35-2.08 μ m, ‘엘로우미미’는 1.39-2.04 μ m의 범위에서 관찰되었다. 염색체 전체의 길이의 합은 ‘프로이트’가 11.23 μ m로 가장 작았으며 ‘알렉산드라’가 15.05 μ m로 가장 크게 관찰되었다. 염색체의 크기 및 배수성은 화분의 크기와 정의 상관관계를 나타냄을 보고된 바(Hwang et al., 2010; Stanley and Linskens, 1974) 본 연구에서 이루어진 장미 염색체에 대한 기본 정보는 배수성과 화분임성과의 관계, 교배 후 후대의 배수성의 구성 등과 같은 추후 연구 등에 이용되어 보다 효율적인 장미 육종을 수행하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 단완(short arm)과

Table 1. Chromosome length of seven rose cultivars.

Chr. #	Cultivars						
	Alexandra	Freud	Little Silver	Teresa	Tineke	Vital	Yellow Mimi
1	2.67 ± 0.11 ²	2.04 ± 0.05	2.24 ± 0.09	2.26 ± 0.09	2.65 ± 0.09	2.08 ± 0.06	2.04 ± 0.08
2	2.41 ± 0.25	1.70 ± 0.09	2.01 ± 0.05	2.14 ± 0.03	2.46 ± 0.08	2.00 ± 0.09	1.90 ± 0.14
3	2.22 ± 0.17	1.60 ± 0.06	1.98 ± 0.19	1.91 ± 0.08	2.28 ± 0.14	1.80 ± 0.08	1.60 ± 0.09
4	2.16 ± 0.15	1.55 ± 0.10	1.89 ± 0.08	1.88 ± 0.07	2.08 ± 0.04	1.68 ± 0.06	1.50 ± 0.07
5	2.09 ± 0.11	1.50 ± 0.16	1.82 ± 0.13	1.80 ± 0.07	1.88 ± 0.08	1.62 ± 0.06	1.49 ± 0.10
6	1.83 ± 0.13	1.44 ± 0.14	1.72 ± 0.03	1.79 ± 0.07	1.75 ± 0.10	1.50 ± 0.13	1.42 ± 0.11
7	1.67 ± 0.18	1.40 ± 0.19	1.64 ± 0.13	1.69 ± 0.22	1.70 ± 0.09	1.35 ± 0.07	1.39 ± 0.19
Total length	15.05	11.23	13.30	13.47	14.80	12.03	11.34

²Mean ± standard errors (n = 5).

장완(long arm)의 비율(arm ratio)로 염색체의 특성을 구분하는 방법은 Levan et al.(1964)에 의해 고안되었으며 염색체를 특징 짓는 가장 기본적인 방법이다. Akasaka et al. (2003)의 연구에 의해 장미 염색체의 구성은 1, 2번 염색체는 중부동원체형(metacentric, m), 나머지 4-7번 염색체는 차중부동원체형(submetacentric, sm) 또는 차단부동원체형(subtelocentric, st)으로 구성되어 있으며 단부동원체형(telocentric, t)은 나타나지 않는다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 장미 염색체의 구성이 중부동원체형 또는 차중부동원체형으로 관찰되었으나 품종에 따라 4m + 2sm + 1st(‘알렉산드라’), 4m + 3sm(‘리틀실버’, ‘테레사’), 5m + 2sm(‘프로이트’, ‘비탈’), 6m + 1sm(‘티네케’, ‘옐로우미미’)으로 다양하게 관찰되었다(Table 2 and Figs. 2A to 2G). 이러한 염색체 조성(karyotype formula)의 차이는 서로 다른 품종을 이용한 염색체 분석에 의해 나타나기도 하며(Hwang et al., 2009) 크기가 작은 염색체를 분석하는 경우 명확한 상태의 중기 상태(metaphase stage)를 관찰하는데 어려움이 있어 전중기(pro-metaphase stage) 상태의 염색체를 관찰함으로써 차이를 나타내기도 한다. 염색체 조성을 명확히 규명하기 위해서는 중기 염색체 관찰을 위한 시료의 전처리 조건 규명, 슬라이드 제작 방법의 확립, 반복실험에 의한 결과 도출, 세포유전학적 기술의 집적 등이 반드시 필요하다.

배수성 검정

체세포 염색체 수 분석 결과, 장미 7품종 모두 4배체(2n = 4x = 28)인 것으로 관찰되었다(Table 2). Hwang et al.(2010)의 연구에서 염색체 검정을 통해 확인된 3배체(2n = 3x = 21) 장미가 정상화분율은 높았으나 실제 임성율이 현저히 떨어지며 이를 이용한 교배조합 검정 결과 교배율이 현저히 떨어지는 것을 관찰한 바 있어 고효율의 장미 육종 전략을 위해서는 장미 육성 전 반드시 배수성에 관한 확인

이 반드시 필요하다. 또한 일부 장미 4배체 품종의 경우 이수체(2n = 4x = 28 + 1 또는 2n = 4x = 28 + 2)가 있으며 이러한 이수체 품종의 경우 화분의 임성이 현저히 떨어지는 결과가 관찰되어 이수체 품종과 화분의 임성에 관한 연구 역시 추가적으로 필요할 것으로 생각된다(자료 미제시).

FISH 핵형분석

FISH 기법을 이용한 핵형분석의 결과는 개개의 염색체를 특징 짓고 상동염색체를 구별하는데 유용하게 이용할 수 있다. 염색체 연구는 종을 동정하고 종간 유연관계를 추적하는데 유용한 세포유전학적 방법으로 이용되고 있으며 장미의 유전적 다양성을 이해하기 위한 새로운 정보를 제공할 수 있다. 장미와 같이 염색체의 길이가 1-3μm로 비교적 작은 식물의 핵형분석을 실시할 때 상동염색체를 찾는 데 어려움이 있다(Hwang et al., 2009). 일반 핵형 분석법(Aceto-orecein, Giemsa staining 등)만으로는 상동염색체를 구분 짓고 염색체의 특징을 규명하는 것이 어려우므로 특정 마커를 이용하여 보다 정밀한 핵형분석을 실시해야 한다. 45S rDNA(18S-5.8S-26S)는 tandem repeats로 대부분의 식물체에 conserved하게 존재하며 1개 혹은 그 이상의 위치를 가지고 염색체 상에 반복적으로 위치하는 유전자이다(Maluszynska and Heslop-Harrison, 1993). 45S rDNA의 수, 크기, 위치는 종에 따라 다양하게 나타나므로 핵형분석을 위한 마커로 유용하게 이용될 수 있다. 이에 본 연구에서는 45S rDNA를 마커로 이용하여 염색체 핵형분석을 실시하였으며 45S rDNA를 탐침으로 한 FISH 핵형분석 결과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. FISH 핵형분석 결과, 4배체의 7품종 모두 4개의 signal이 2번 염색체 단완 말단부위에서 관찰되었다(Figs. 1A to 1G). 일반적으로 45S rDNA는 상동염색체 내에서 크기, 수 등이 균일한 패턴을 나타낸다. 그러나 본 연구 결과에서는 45S rDNA signal의 intensity가 균일하게 나타

Table 2. Summary of karyotypic data for seven rose cultivars.

Cultivars	Ploidy	Chromosome length (μm)		Karyotype formula	Number of 45S rDNA signals
		Shortest	Longest		
Alexandra	2n = 4x = 28	1.67 ± 0.18	2.67 ± 0.11	4m ^z +2sm ^y +1st ^x	4 signals
Freud	2n = 4x = 28	1.40 ± 0.19	2.04 ± 0.05	5m + 2sm	4 signals
Little Silver	2n = 4x = 28	1.64 ± 0.13	2.24 ± 0.09	4m + 3sm	4 signals
Teresa	2n = 4x = 28	1.69 ± 0.22	2.26 ± 0.09	4m + 3sm	4 signals
Tineke	2n = 4x = 28	1.70 ± 0.09	2.65 ± 0.09	6m + 1sm	4 signals
Vital	2n = 4x = 28	1.35 ± 0.07	2.08 ± 0.06	5m + 2sm	4 signals
Yellow Mimi	2n = 4x = 28	1.39 ± 0.19	2.04 ± 0.08	6m + 1sm	4 signals

^zMetacentric.

^ySubmetacentric.

^xSubtelocentric.

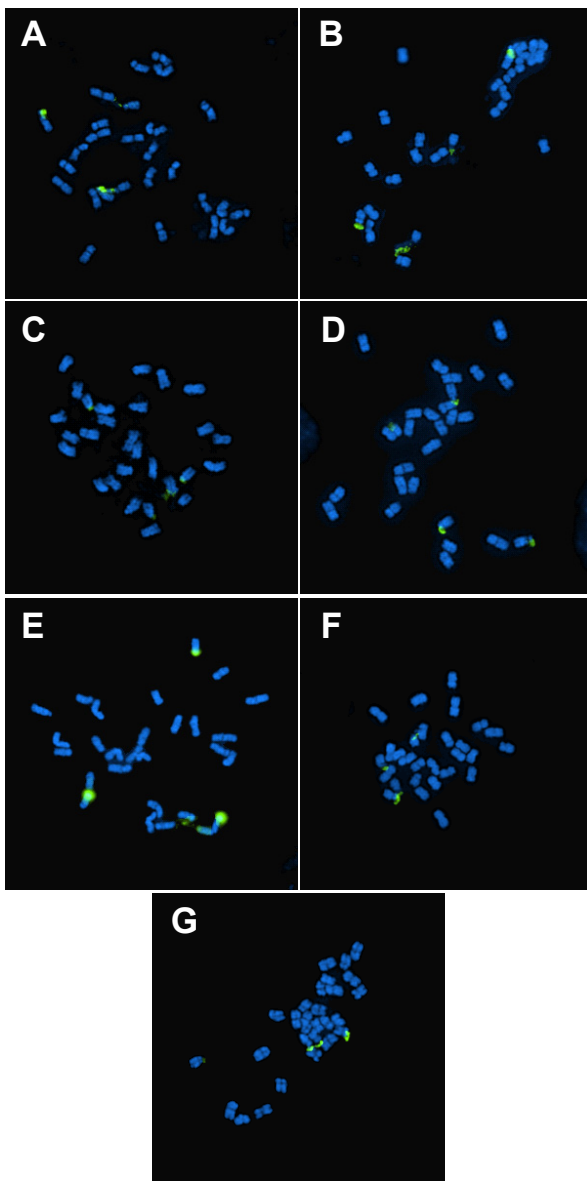


Fig. 1. Fluorescence in situ hybridization using 45S rDNA as probe in seven Rose cultivars. 'Alexandra' (A), 'Freud' (B), 'Little Silver' (C), 'Teresa' (D), 'Tineke' (E), 'Vital' (F), 'Yellow Mimi' (G).

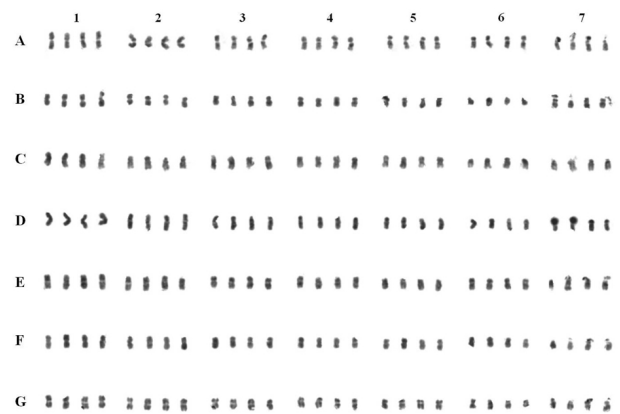


Fig. 2. Karyotype analysis of 'Alexandra' (A), 'Freud' (B), 'Little Silver' (C), 'Teresa' (D), 'Tineke' (E), 'Vital' (F), 'Yellow Mimi' (G) based on the measurement of mitotic metaphase complements.

나지 않음을 관찰할 수 있다. 이는 장미 육종에 있어서의 오랜 역사와 복잡한 교배 양식 등을 거치면서 후대의 유전적 조합이 다양해졌음을 의미할 수 있다. Flory(1950)는 이배체와 배수체 장미의 지리학적 유래는 동아시아에서이며 이후 북아메리카로 이동하였다고 보고한 바 있다. 이에 대해 Akasaka(2003) 등의 연구에서는 45S rDNA를 이용한 FISH 핵형분석을 통해 2배체인 *R. foliolosa*의 45S rDNA signal이 다른 2배체의 45S signal의 수와 동일하지 않음을 보고하며 *R. foliolosa*가 북아메리카로 이동하는 과정에 chromosomal rearrangement가 일어났을 것이라고 보고한 바 있다. 이처럼 45S rDNA를 이용한 FISH 핵형분석은 단순히 염색체의 특징을 규명하는 것뿐만 아니라 다양한 분야에서 응용되어 장미 연구에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

초 록

효율적인 교배를 위해서는 모본 또는 부분으로 사용하게

될 개체의 배수성 검정이 선행되어야 한다. 이에 본 연구에서는 국내 장미 신품종 육성 프로그램에 이용되고 있는 장미 7품종의 FISH 핵형분석을 통하여 배수성을 확인하고 이를 육종에 있어서 기초 자료로 이용하고자 수행되었다. 배수성 검정 결과, 7품종 모두 4배체($2n = 4x = 28$)인 것으로 관찰되었다. FISH 핵형분석 결과, 45S rDNA는 4개의 signal이 7번 염색체 단완의 말단부위에서 관찰되었다. 염색체의 길이 관찰 결과, ‘알렉산드라’는 1.67-2.67 μm , ‘프로이트’는 1.40-2.04 μm , ‘리틀실버’는 1.64-2.24 μm , ‘테레사’는 1.69-2.26 μm , ‘티네케’는 1.70-2.65 μm , ‘비탈’은 1.35-2.08 μm , ‘엘로우미미’는 1.39-2.04 μm 로 관찰되었다. 염색체 전체 길이의 합은 프로이트 품종이 11.23 μm 로 가장 작았으며 알렉산드라 품종이 15.05 μm 로 가장 크게 관찰되었다. 염색체의 조성은 중부동원체형, 차중부동원체형, 차단부동원체형으로 구성되었으나 차단부염색체는 관찰되지 않았다.

추가 주요어: 육종, 염색체, 재배종 장미, 배수성, 리보솜 DNA

인용문헌

Akasaka, M., Y. Ueda, and T. Koba. 2003. Karyotype analysis of wild rose species belonging to septets B, C, and D by molecular cytogenetic method. *Breeding Sci.* 53:177-182.

Darlington, C.D. and A.P. Wylie. 1955. Chromosome atlas of flowering plant. George Allen & Unwin Ltd., London, UK. p. 134-138.

Fernández-Romero, M.D., A.M. Torres, T. Millán, J.I. Cubero, and A. Caberera. 2001. Physical mapping of ribosomal DNA on several species of the subgenus *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* 103:835-838.

Flory, W.S. Jr. 1950. Pollen condition in some species and hybrid of *Rosa* with a consideration of associated phylogenetic factors. *Virg. J. Sci.* 1:11-59.

Gi, G.Y., K.J. Choi, T.S. Na, S.K. Kim, G.S. Jo, G.C. Koh, T.H. Han, and C.S. Ahn. 2004. A rose cultivar, ‘Scarla’ with

orange-red flower and high productivity. *Kor. J. Breed. Sci.* 36:115-116.

Gi, G.Y., T.S. Na, J.K. Kim, K.J. Choi, M.S. Choi, Y.S. Lee, H.R. Shin, K.C. Cho, Y.C. Kim, and T.H. Han. 2006. A new cultivar, ‘Danmi’ with white color and few prickles for cut flower. *Kor. J. Breed. Sci.* 38:63-64.

Hwang, Y.J., H.H. Kim, S.J. Kwon, T.J. Yang, H.C. Ko, B.S. Park, J.D. Chung, and K.B. Lim. 2009. Karyotype analysis of three *Brassica* species using five different repetitive DNA markers by Fluorescence in situ Hybridization. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 27:456-463.

Hwang, Y.J., C.M., Song, M.K., Kwon, S.T., Kim, W.H., Kim, Y.Y., Han, T.H., Han, and K.B. Lim. 2010. An Increment of crossing efficiency with consideration of pollen viability analysis in rose. *Flower Res. J.* 18:193-200.

Jones, S.B. and A.E. Luchsinger. 1987. *Plant systematics*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, USA.

Kim, J.K., J.B. Kim, and Z.H. Kim. 2002. Breeding of rose ‘Sabrina’ with vigorous growth and pink color. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 20:360-362.

Kim, T.J. 1996. *Korean resources plants (II)*. Seoul Natl. Univ. Press., Seoul, Korea p. 151-156.

Kim, W.H., K.S. Lee, B.S. Yoo, E.K. Lee, Y.N. Oh, Y.J. Kim, B.H. Kim, and S.K. Chung. 2001. Breeding of spray rose ‘Pink Lady’ with good shape and pink color. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 19(Suppl. 1):118. (Abstr.)

Krüssmann, G. 1982. *Roses*. B.T. Batsford Ltd., London, UK.

Lee, T.B. 1996. *Illustrated flora of Korea*. Hyang Mun Sa, Seoul, Korea p. 447-450.

Levan, A., K. Fredga, and A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

Ma, Y., M.N. Islam-Faridi, C.F. Crane, Y. Ji, D.M. Stelly, H.J. Price, and D.H. Byrne. 1997. In situ hybridization of ribosomal DNA to rose chromosomes. *J. Heredity* 88:158-161.

Maluszynska, J. and J. Heslop-Harrison. 1993. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. *Genome* 36:774-781.

Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A.M. Torres, and J.I. Cubero. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* 92:273-277.

Stanley, R.G. and H.F. Linskens. 1974. *Pollen: Biology, biochemistry management*. Springer-Verlag, New York, USA.